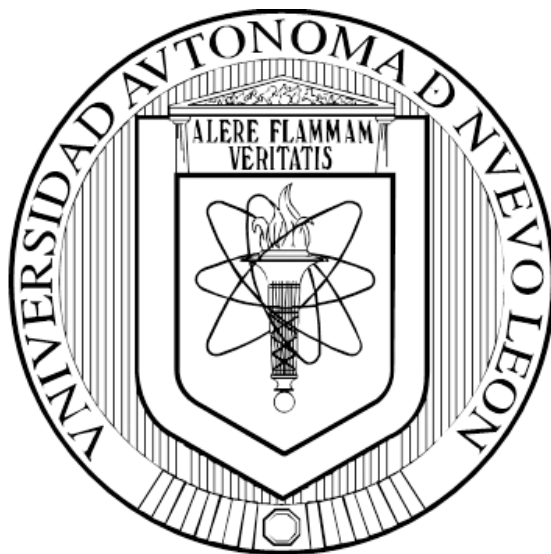


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS

**USO DE METALES DE TRANSICIÓN EN ENSAYOS
COMBINATORIOS METAL-ANTIBIÓTICO PARA LA RE-
SENSIBILIZACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES**

POR

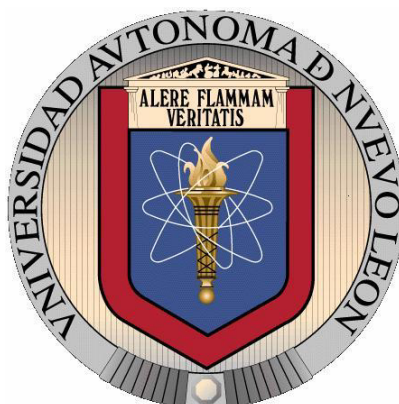
JAVIER ALBERTO GARZA CERVANTES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

JUNIO, 2016

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



USO DE METALES DE TRANSICIÓN EN ENSAYOS COMBINATORIOS
METAL-ANTIBIÓTICO PARA LA RE-SENSIBILIZACIÓN DE BACTERIAS
RESISTENTES

Por

JAVIER ALBERTO GARZA CERVANTES

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN
CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada

junio de 2016

USO DE METALES DE TRANSICIÓN EN ENSAYOS COMBINATORIOS
METAL-ANTIBIÓTICO PARA LA RE-SENSIBILIZACIÓN DE BACTERIAS
RESISTENTES

Aprobación de tesis:

Dr.

Presidente

Dr.

Secretario

Dr.

Vocal

USO DE METALES DE TRANSICIÓN EN ENSAYOS COMBINATORIOS
METAL-ANTIBIÓTICO PARA LA RE-SENSIBILIZACIÓN DE BACTERIAS
RESISTENTES

Revisión de tesis:

Dr. José Rubén Morones Ramírez

ASESOR

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Aracely Hernández Ramírez

SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que, directa o indirectamente, estuvieron presentes durante mi vida profesional.

A la Facultad de Ciencias Químicas y CONACyT por el apoyo económico que me brindaron durante el periodo en que se desarrolló este trabajo, así como a la escuela de Graduados en Ciencias de la Facultad de Ciencias Químicas por facilitar las instalaciones y equipos necesarios para el mismo.

A mi asesor de tesis, el Dr. Rubén Morones, por darme la oportunidad y el espacio para trabajar a su lado, apoyarme en cada momento de duda y compartir sus conocimientos para ayudarme a mejorar en mi vida profesional. Por siempre buscar cómo hacernos sentir más cómodos en nuestro ambiente de trabajo y buscar la forma de que no nos falte equipo, material o reactivos para el desarrollo de los proyectos.

A mi comité tutorial, Dra. María Elena Cantú, Dr. Xristo Zárate y Dr. Alberto Gómez, por su apoyo, por tomarse el tiempo necesario para evaluar mis avances en este proyecto, compartir sus conocimientos, aconsejarme y aplicar las correcciones necesarias en mi investigación para guiarme en el camino correcto.

A mis profesores, por tener la paciencia necesaria para impartir los conocimientos en las diferentes materias que cursé durante esta maestría, por orientarme cuando no comprendía el tema a manejar y apoyarme cuando me presentaba ante ellos con dudas.

A mis padres, por siempre estar cuando los necesito, por apoyarme desde que no sabía qué carrera universitaria estudiar hasta el día de hoy. Por todo el apoyo económico, social, y moral tanto académica como personal. Sé que siempre podré contar con su apoyo incondicional y les agradezco mucho criarme de esta manera, ya que gracias a ustedes puedo decir con orgullo quién soy como persona. A mis hermanas por aguantarme en todos estos años y estar siempre que las necesitaba.

A Lizeth Carrillo por todo el apoyo que me ha brindado, esperar a que me desocupara para poder estar con ella, aguantar todas las salidas interrumpidas por los experimentos académicos y por siempre estar ahí cuando la necesito. A mis compañeros de generación que me permitieron compartir esta etapa de vida con ellos. A mis mariachis porque siempre puedo contar con ellos. A Margarita Ortiz por apoyarme y lavarme el cerebro para estudiar un posgrado, por las tardes divertidas, salidas a comer y los chistes interminables de las situaciones diarias. A los integrantes del Laboratorio de Biotecnología 3, Albert, Augusto, Mario, Paco por aconsejarme, apoyarme, ayudarme en los experimentos y por todas esas horas de diversión y “estudio” que compartimos. A Meza e Ivansillo por aguantar todos mis humores matutinos y las situaciones de tedioso tiempo laboral que compartieron conmigo y en especial el que tuvieron que hacer por su cuenta.

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mi familia.

*A mis padres, Ana María Ceroantes Villegas y Javier Garza Martínez, mis
modelos de vida y ejemplos a seguir.*

A mis hermanas Ana Elisa Garza Ceroantes y Paola Alejandra Garza Ceroantes.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Los Antibióticos y la problemática de la resistencia.....	10
1.2 Generalidades sobre mecanismos de acción.....	12
1.3 Los metales de transición y sus efectos sobre las bacterias.....	15
CAPÍTULO 2.....	19
2. ANTECEDENTES.....	19
CAPÍTULO 3.....	23
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	23
3.1 Hipótesis.....	23
3.2 Objetivo General.....	23
3.3 Objetivos Específicos.....	24
CAPÍTULO 4.....	25
4. METODOLOGÍA.....	25
4.1 Materiales, reactivos y equipo.....	25
4.2 Cepas bacterianas y medio de cultivo.....	26
4.3 Identificación de la fase de crecimiento exponencial de las cepas bacterianas a utilizar.....	27
4.4 Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de los metales de transición y antibióticos incluidos en el estudio.....	27
4.5 Realización de pruebas combinatorias metal-antibiótico en cepas sensibles a los antibióticos en el estudio.....	30
4.6 Pruebas de sensibilización a antibióticos en cultivos en fase estacionaria.....	32
4.7 Obtención de cepas resistentes a los antibióticos utilizados.....	33
4.7.1 Preparación y transformación de bacterias electro-competentes.....	33
4.7.2 Selección de bacterias transformadas y extracción de DNA plasmídico.....	34
4.8 Identificación de concentraciones mínimas inhibitorias para las cepas resistentes a antibióticos obtenidas.....	36
4.9 Realización de pruebas combinatorias metal-antibiótico para re-sensibilización a antibióticos en las cepas resistentes obtenidas....	36
4.10 Análisis de datos.....	36
4.11 Manejo y disposición de residuos.....	37
CAPÍTULO 5.....	38
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> en medio LB (Miller).....	38
5.2 Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias de los metales y antibióticos.....	39
5.3 Comportamiento de cultivos en fase de crecimiento exponencial de <i>E. coli</i> ATCC 11229 en combinaciones metal- antibiótico...	40
5.4 Análisis de interacciones entre metales y antibióticos en cultivos en fase de crecimiento exponencial de <i>E. coli</i> ATCC 11229.....	46

5.5	Comportamiento de cultivos en fase estacionaria de <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 en combinaciones metal-antibiótico.....	49
5.6	Obtención de <i>E. coli</i> resistente a ampicilina y kanamicina.....	50
5.7	Comportamiento de cultivos en fase de crecimiento exponencial de cepas transformadas de <i>E. coli</i> en combinaciones metal-antibiótico.....	52
5.8	Análisis de interacciones entre metales y antibióticos en cultivos en fase de crecimiento exponencial de cepas transformadas <i>E. coli</i>	56
5.9	Curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> en medio TSB.....	58
5.10	Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias de los metales y antibióticos.....	58
5.11	Comportamiento de cultivos en fase de crecimiento exponencial de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 en combinaciones metal-antibiótico.....	59
5.12	Análisis de interacciones entre metales y antibióticos en cultivos en fase de crecimiento exponencial de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	64
5.13	Comportamiento de cultivos en fase estacionaria de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 en combinaciones metal-antibiótico.....	67
5.14	Obtención de <i>S. aureus</i> resistente a ampicilina, kanamicina y meticilina.....	68
5.15	Comportamiento de cultivos en fase de crecimiento exponencial de cepas transformadas de <i>S. aureus</i> en combinaciones metal-antibiótico.....	70
5.16	Análisis de interacciones entre metales y antibióticos en cultivos en fase de crecimiento exponencial de cepas transformadas <i>S. aureus</i>	73
CAPÍTULO 6.....		76
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	76
CAPÍTULO 7.....		88
7.	CONCLUSIONES.....	88
CAPÍTULO 8.....		90
8.	ANEXOS.....	90
CAPÍTULO 9.....		94
9.	REFERENCIAS.....	94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Metales traza necesarios para los microorganismos.....	16
Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>E. coli</i> ATCC11229.....	40
Tabla 3. Efecto bactericida metal-ampicilina en cepa de <i>E. coli</i> ATCC 11229 en fase estacionaria de crecimiento.....	50
Tabla 4. Características de las cepas de <i>E. coli</i> transformadas.....	51
Tabla 5. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>S. aureus</i> ATCC 6538..	59
Tabla 6. Efecto bactericida metal-antibiótico en cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538 en fase estacionaria de crecimiento.....	68
Tabla 7. Características de las cepas de <i>S. aureus</i> transformadas.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Objetivos comunes de diversos antibióticos.....	12
Figura 2. Estructuras de antibióticos.....	14
Figura 3. Mecanismos generales de resistencia a antibióticos.....	15
Figura 4. Combinaciones de prueba típicas para ensayos checkerboard de un componente x (antibiótico) y un componente y (metal de transición).....	31
Figura 5. Crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 11229.....	39
Figura 6. Efecto inhibitorio de kanamicina potenciado por metales en cepa de <i>E. coli</i> ATCC 11229.....	43
Figura 7. Efecto inhibitorio de ampicilina potenciado por metales en cepa de <i>E. coli</i> ATCC 11229.....	45
Figura 8. Tipo de interacción metal-kanamicina en cepa de <i>E. coli</i> ATCC 11229.....	47
Figura 9. Tipo de interacción metal-ampicilina en cepa de <i>E. coli</i> ATCC 11229.....	48
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa para las cepas de <i>E. coli</i>	51
Figura 11. Efecto inhibitorio de kanamicina potenciado por metales en cepa de <i>E. coli</i> resistente a este antibiótico.....	53
Figura 12. Efecto inhibitorio de ampicilina potenciado por metales en cepa de <i>E. coli</i> resistente a este.....	55
Figura 13. Tipo de interacción metal-kanamicina en cepa de <i>E. coli</i> resistente a este antibiótico.....	57
Figura 14. Tipo de interacción metal-ampicilina en cepa de <i>E. coli</i> resistente a este antibiótico.....	57
Figura 15. Crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	58
Figura 16. Efecto inhibitorio de kanamicina potenciado por metales en cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	61
Figura 17. Efecto inhibitorio de ampicilina potenciado por metales en cepa de <i>S. aureus</i> ATCC6538.....	63
Figura 18. Efecto inhibitorio de meticilina potenciado por metales en cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	64
Figura 19. Tipo de interacción metal-kanamicina en cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	65
Figura 20. Tipo de interacción metal-ampicilina en cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	66
Figura 21. Tipo de interacción metal-meticilina en cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 6538.....	67
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa para las cepas de <i>S. aureus</i>	70
Figura 23. Efecto inhibitorio de kanamicina potenciado por metales en cepa de <i>S. aureus</i> resistente a este antibiótico.....	71
Figura 24. Efecto inhibitorio de antibióticos β -lactámicos potenciados por metales en cepa de <i>S. aureus</i> resistente a estos.....	72

Figura 25. Tipo de interacción metal-kanamicina en cepa de <i>S. aureus</i> resistente a este antibiótico.....	74
Figura 26. Tipo de interacción metal-antibiótico β -lactámico en cepa de <i>S. aureus</i> resistente a estos.....	75

NOMENCLATURA

%	Porcentaje
°C	Grados Centígrados
μL	Microlitro
Ag	Plata
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	American Type Culture Collection
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
Cd	Cadmio
Células/mL	Células por mililitro
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Co	Cobalto
Cu	Cobre
DL ₅₀	Dosis Letal 50
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	Y otros
g/L	Gramos por litro

LB	Luria-Bertani
LD ₅₀	Dosis Letal 50
LSD	Diferencia mínima significativa
mg/Kg	Miligramo por kilogramo
mg/mL	Miligramo por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mQH ₂ O	Agua grado molecular
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ng	Nanogramos
Ni	Níquel
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TAE	Tris, acetato y EDTA
TSB	Medio soya tripticaseína
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Voltios
Zn	Zinc

RESUMEN

Javier Alberto Garza Cervantes

Fecha de graduación: Junio, 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: Uso de metales de transición en ensayos combinatorios metal-antibiótico para la re-sensibilización de bacterias resistentes.

Número de páginas: 99

Candidato para el grado de
Maestría en Ciencias con
Orientación en Microbiología
Aplicada

Área de estudio: Desarrollo de agentes terapéuticos

Desde que comenzó la producción en masa de los antibióticos se logró combatir de mejor manera las infecciones bacterianas, pero con este desarrollo tecnológico creció también la probabilidad de la aparición de cepas resistentes a estos fármacos. Recientemente se ha investigado más en esta área debido a que cada vez son más las zonas geográficas afectadas, así como la variedad de los microorganismos resistentes. Una de las estrategias para combatir este problema es reintroducir los antibióticos que previa y actualmente se encuentran en uso al combinarlos con agentes sensibilizantes, los cuales permitirían vencer la resistencia a antibióticos.

En el presente trabajo se utilizan combinaciones de metales de transición con antibióticos, siendo estos metales Cu(II), Cd(II), Co(II), Ni(II) y Zn(II), para estudiar si son capaces de sensibilizar a cultivos de *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus* a los antibióticos utilizados, y posteriormente probar si poseen la capacidad para re-sensibilizar cepas de estos microorganismos resistente a un antibiótico específico.

Mediante la determinación de concentraciones mínimas inhibitorias se seleccionaron las concentraciones a probar, y se realizaron combinaciones metal-antibiótico siguiendo la metodología checkerboard. Se realizaron pruebas de inhibición en una cepa de *Escherichia coli* ATCC 11229, observando que es posible utilizar Cu(II), Co(II), Cd(II) y Ni(II) para inhibir esta cepa en combinación con ampicilina, mientras que Cu(II), Zn(II), Co(II) y Cd(II) se pueden utilizar para causar este efecto con kanamicina. Siguiendo la misma metodología con la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se observó que es posible utilizar Ni(II) para inhibir el cultivo en combinación con los antibióticos β -lactámicos ampicilina y meticilina, mientras que Cu(II), Zn(II), Co(II) y Cd(II) son capaces de inhibir el crecimiento de la cepa al combinarse con kanamicina.

Utilizando los plásmidos pUC57 y pGEX4T2 se transformaron las cepas para conferirles resistencia a los antibióticos utilizados, sometiéndolas a las mismas pruebas que aquellas sensibles. En *E. coli* se observó que Cu(II), Cd(II) y Ni(II) poseen la capacidad de re-sensibilizar a la cepa resistente a ampicilina, mientras que Cu(II) Zn(II) y Cd(II) son capaces de causar este efecto la cepa resistente a kanamicina. Cu(II), Zn(II) y Cd(II) lograron re-sensibilizar *S. aureus*

resistente a kanamicina, mientras que no se logró una re-sensibilización en las cepas resistentes a los antibióticos β -lactámicos utilizados.

Una búsqueda bibliográfica nos encaminó a plantear la utilización de combinaciones metal-antibiótico aquí presentadas en materiales de uso tópico como posible aplicación terapéutica como estrategia para combatir las problemáticas de infecciones bacterianas resistentes y no resistentes, debido a que las concentraciones que se utilizan en el presente trabajo se encuentran por debajo de las reportadas como dañinas por esta vía.

Por último se puede concluir que utilizar los metales de transición Cu(II), Zn(II), Co(II), Cd(II) y Ni(II) para sensibilizar bacterias a antibióticos, así como para disminuir la capacidad de crecimiento de las bacterias resistentes a los mismos presenta ser un área de oportunidad para combatir la problemática relacionada con las enfermedades infecciosas persistentes por este tipo de bacterias.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los antibióticos y la problemática de la resistencia

Uno de los acontecimientos que causó un fuerte impacto en el área de la terapéutica humana en el siglo XX fue el descubrimiento de los antibióticos, y a partir de esto el desarrollo de una gran diversidad de antibióticos y agentes antimicrobianos [1]. Así las compañías farmacéuticas comenzaron su producción a gran escala, aumentando la accesibilidad de los mismos a la población, y con esto la probabilidad de la aparición de cepas bacterianas resistentes a estos, debido a que el uso inapropiado de agentes y medicamentos antimicrobianos acelera este fenómeno, el cual se da de manera natural en las comunidades microbianas, y las prácticas inapropiadas para el control de las infecciones propician la propagación de las cepas que han adquirido la resistencia a los diversos agentes antimicrobianos [2]. Tal es el caso del antibiótico penicilina, descubierta por Fleming en 1928, que se comenzó a producir en masa para el año 1943 mejorando dramáticamente la problemática de enfermedades infecciosas, pero al cabo de unos cuantos años, 1947, comenzaron a aparecer casos de cepas resistentes a este [3].

La resistencia a los agentes antimicrobianos se puede definir como la capacidad de un microorganismo de sobrevivir a la exposición de un agente, o varios, al cual era originalmente vulnerable [2]. Con esto se entiende que una cepa bacteriana puede ser resistente a más de un antibiótico, la resistencia a múltiples fármacos fue detectada por primera vez entre bacterias entéricas como *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*, al final de los años 1950s y principios de los 1960s[4]

La resistencia a agentes antimicrobianos, como se puede ver, no es una problemática nueva, pero el número de organismos que las adquieren, las localizaciones geográficas que están siendo afectadas y la amplitud de resistencia en los organismos individuales no tienen precedentes[5]. Además, los casos de infecciones por bacterias resistentes a antibióticos es un problema en gran escala que afecta de manera significativa la salud pública[6], ya que reduce considerablemente la posibilidad de tratar infecciones de manera efectiva, además de incrementar el riesgo a presentar complicaciones y de un desenlace fatal[7].

En un informe reciente emitido por la OMS[8] se reporta que en las Américas hay una elevada resistencia de *E. coli* a cefalosporinas de tercera generación y a fluoroquinolonas, dos clases importantes y muy utilizadas de fármacos antibacterianos. De manera similar, la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a las cefalosporinas de tercera generación también es elevada y generalizada. En algunos entornos, hasta un 90% de los casos de infecciones son causados por *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA, por sus siglas en

inglés, Methicilin Resistance *Staphylococcus aureus*), lo cual significa que el tratamiento con los antibióticos habituales no funciona. Para darnos una idea de las complicaciones que estas infecciones pueden causar en cuestiones económicas, Kim *et al.*[9] calculan que MSRA genera un costo en todos los hospitales canadienses de \$42 - \$59 millones de dólares anualmente.

1.2 Generalidades sobre mecanismos de acción

Los antibióticos actúan de distintas maneras sobre los microorganismos, sus mecanismos se pueden englobar en tres objetivos comunes[10]: la síntesis de la pared celular, la síntesis de proteínas bacterianas y por último la replicación y reparación del DNA.

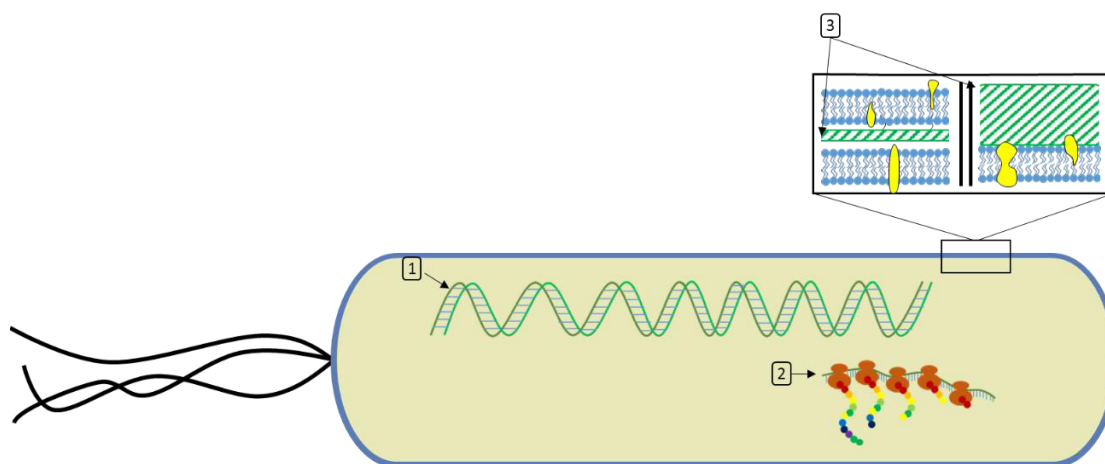


Figura 1. Objetivos comunes de diversos antibióticos. Representación de las estructuras bacterianas que son atacadas por una variedad de antibióticos; 1: la integridad de la doble cadena de DNA por ejemplo al ser atacada por las quinolonas dejando a este vulnerable; 2: la síntesis de proteínas se ve comprometida cuando los antibióticos, como los aminoglucósidos o los macrólidos, intervienen en el correcto ensamblaje de los ribosomas e interpretación de la cadena poli peptídica; y 3: la síntesis e integridad de la pared celular, la cual se ve comprometida cuando intervienen antibióticos como las penicilinas y derivados o las cefalosporinas impiden la formación de la pared celular.

Una de las familias de antibióticos que actúan a nivel de la síntesis de la pared celular es la de los β -lactámicos, estos ejercen su efecto sobre los dominios

transpetidasas y transglicosidasas, conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBPs por sus siglas en inglés, *penicillin-binding proteins*), actuando como pseudosustratos que interrumpen la unión al sitio activo impidiendo el correcto entrecruzamiento de las cadenas peptídicas que conforman el peptidoglicano, dejando la célula mecánicamente débil y susceptible a daños por presión osmótica y lisis[10]. Entre estos se encuentran ampicilina y meticilina. La primera es un derivado de la penicilina, introducido en 1967, que posee un grupo funcional carboxilo en lugar de un grupo amino[11]; la segunda, un derivado semi-sintético, fue inicialmente utilizada contra cepas resistentes a penicilinas, mostrando buenos resultados al ser estable cuando es atacada por β -lactamasas[12].

La familia de los antibióticos aminoglucósidos interviene en las funciones celulares correspondientes a la síntesis de proteínas al unirse al sitio ribosomal-A[13] de la subunidad 30S de los ribosomas causando, una vez unida a la subunidad 50S[14], una mala interpretación de la lectura o una interrupción prematura de la síntesis proteica. Entre estos se encuentra la kanamicina, un antibiótico de amplio espectro purificado en mayor parte como kanamicina A, y en menor grado como kanamicina B, C y D[15].

Entre los antibióticos que intervienen en la síntesis y reparación del DNA se encuentran las quinolonas, un grupo de antibióticos sintéticos que afecta tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas. Estos actúan sobre la enzima topoisomerasa II, conocida como DNA girasa que se encarga de plegar y enrollar el DNA bacteriano, inhibiendo la subunidad A e interrumpiendo su actividad,

dejando el DNA expuesto a la acción de las exonucleasas bacterianas[16]. Uno de los antibióticos pertenecientes a esta familia es la fluoroquinolona ciprofloxacino, usado de manera rutinaria para el tratamiento de enfermedades infecciosas en vías urinarias[17].

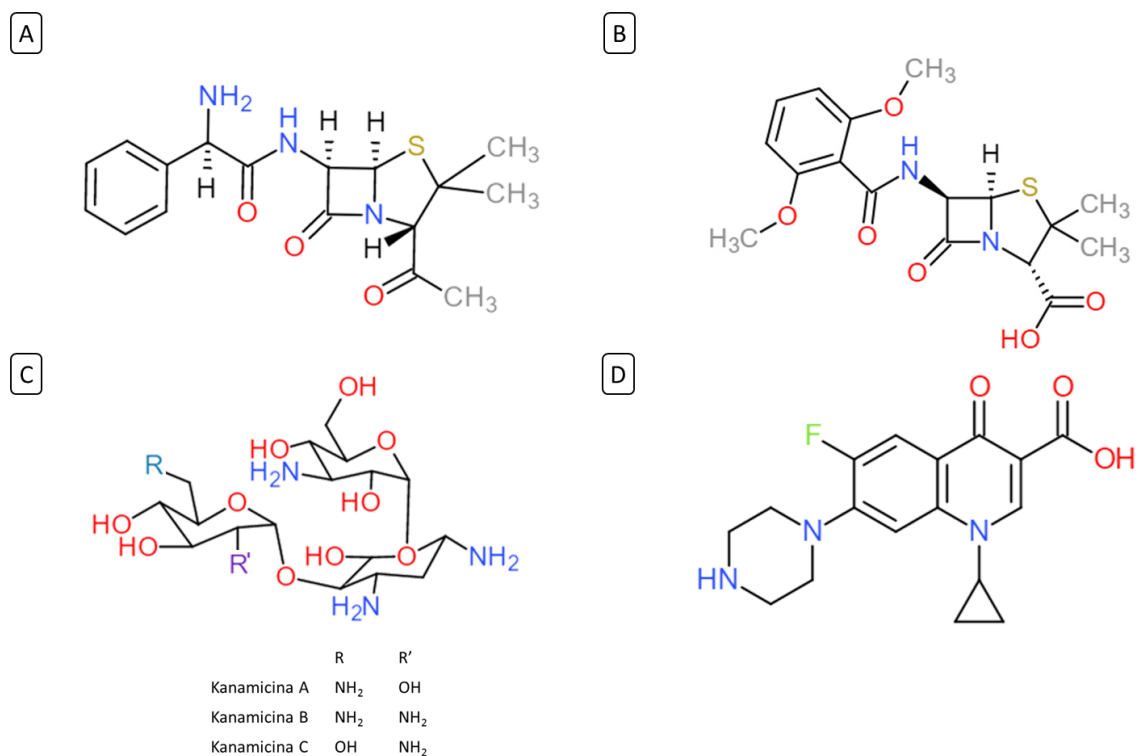


Figura 2. Estructuras de antibióticos. Representación en 2D de la estructura de algunos antibióticos, A y B: corresponden a las estructuras de ampicilina y metilicina respectivamente, dos antibióticos beta-lactámicos derivados de la penicilina, puede observarse su diferencia en el sustituyente del grupo carboxilo; C: estructura general de kanamicina, se muestran debajo los sustituyentes que conforman sus variantes estructurales; y D: estructura de la fluoroquinolona ciprofloxacino.

Existen diferentes mecanismos por los cuales los microorganismos son capaces de resistir los efectos causados por los diversos antibióticos, entre los cuales se encuentran[1, 10]: la destrucción del antibiótico por la acción de enzimas bacterianas, forma en que actúan las enzimas beta-lactamasas en las cepas resistentes a penicilina y derivados; la modificación enzimática de los

grupos funcionales del antibiótico, como la adición del fosfato terminal del ATP a las moléculas de kanamicina[18]; y a través de estructuras proteicas llamadas bombas de flujo, encargadas de expulsar una gran variedad de moléculas dañinas hacía el exterior de la bacteria.

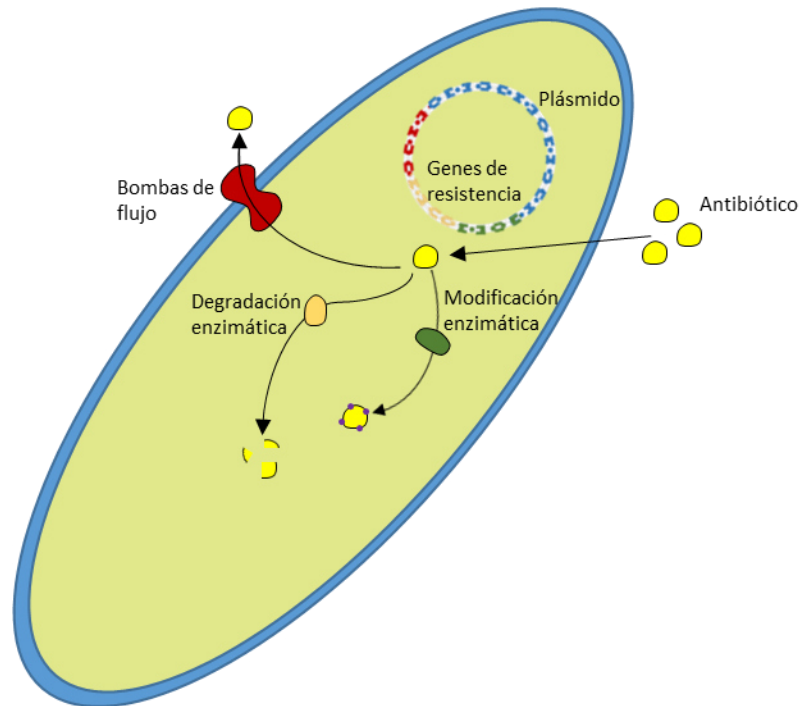


Figura 3. Mecanismos generales de resistencia a antibióticos. Representación gráfica de los diferentes mecanismos por los cuales un microorganismo puede crear resistencia a uno o varios antibióticos, mediante la expresión de diferentes tipos de proteínas codificadas en uno o varios plásmidos. Las bombas de flujo expulsan a los antibióticos del citosol, por otra parte el antibiótico puede sufrir modificaciones por parte de las enzimas al agregar/cambiar grupos funcionales que atenúen su función, así como sufrir degradación por acción de enzimas liberando fragmentos de la molécula original con nula actividad antimicrobiana.

1.3 Los metales de transición y sus efectos sobre las bacterias

De manera natural las bacterias, y los demás microorganismos, interactúan con una gran variedad de compuestos, orgánicos e inorgánicos como los metales, a lo largo de la célula. Estos pasan por la membrana externa, el periplasma y la membrana interna, en el caso de las bacterias Gram-negativas,

hacía el citoplasma a través de distintas estructuras como porinas, transportadores de membrana, así como por la membrana misma.[19]

Es bien sabido que existe una variedad de funciones esenciales para un correcto desempeño celular, las cuales no pueden ser satisfechas por moléculas orgánicas. De esta forma las bacterias se han ido adaptando a lo largo del tiempo para desarrollar estas funciones con la ayuda de diversos metales. Estos son llamados metales esenciales, entre los que cuales se encuentran Na, Mg, K, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Zn, Cu, entre otros como el Cd y B que son empleados en funciones especiales[17, 20]. Sin embargo estos son letales para las células cuando se presentan en exceso[20].

Se estima que de un cuarto a un tercio de todas las proteínas requieren metales para su correcto funcionamiento y debido a que son flexibles ofrecen una selección estérica entre los diversos metales que se encuentran en el entorno del polipéptido naciente[21]. De esta manera, los metales son requeridos por estas para desarrollar las diversas funciones celulares necesarias para el correcto desempeño celular.

Tabla 1. Metales trazas necesarios para los microorganismos	
Cromo (Cr)	Requerido por los mamíferos para metabolismo de glucosa, posible requerimiento para los microorganismos.
Cobalto (Co)	Necesario para el correcto funcionamiento de la vitamina B ₁₂ así como para la transcarboxilasa en bacterias del ácido propiónico.

Cobre (Cu)	Requerido para la respiración celular, citocromo <i>c</i> oxidasa y algunas superóxido oxidases
Hierro (Fe)	Utilizado en citocromos, catalasas, peroxidases, proteínas con Fe y S.
Manganeso (Mn)	Activador de gran cantidad de enzimas, presente en ciertas superóxido dismutasa.
Níquel (Ni)	Utilizado en la mayoría de las hidrogenasas, así como en las deshidrogenasas del monóxido de carbono.
Zinc (Zn)	Requerido en la anhidrasa carbónica, RNA y DNA polimerasas, y en muchas proteínas que se unen al DNA.
Funciones y estructuras donde se utilizan y aprovechan los diversos metales traza que se encuentran en el citoplasma celular. Información obtenida de [17]	

Diversos metales de transición se han utilizado desde épocas remotas de la humanidad para diferentes actividades y propósitos, como la fabricación de herramientas y armas, la preservación de alimentos y agua potable, así como para la prevención y el tratamiento de heridas[20, 22].

Entre los mecanismos por los cuales los metales de transición ejercen su acción se encuentran[20]: incremento de especies reactivas de oxígeno (*ing.* ROS), agotamiento de antioxidantes, alteraciones en el funcionamiento de la membrana y de las proteínas, así como interferencia con la incorporación de nutrientes.

Ciertos metales, entre ellos Cu, Co, Ni y Cr, pueden causar estrés oxidativo aumentando la cantidad de ROS presente en la célula[23], actuando como catalizadores del sistema Fenton *in vitro* en conjunto con Fe[24], además pueden causarla destrucción, directa o indirecta, de los grupos [4Fe-4S] de las proteínas, liberando Fe adicional para estas reacciones[20].

Algunos metales como Cu(I), Ag(I), Cd(II), Co(II), Ni(II), Zn(II) tienden a asociarse fuertemente con bases débiles como los grupos sulfridrilo de las proteínas, siendo este uno de sus principales mecanismos de toxicidad[24], y consecuentemente, la actividad antibacteriana de estos metales es aproximadamente proporcional a su afinidad por S[25] provocando interrupción en las actividades celulares desarrolladas por una gran variedad de proteínas y enzimas. Por ejemplo, Cd(II) y Zn(II) inhiben enzimas a concentraciones en el que inician bacteriostasis al dañar los grupos Fe-S de manera independiente a la formación de ROS[26]. Así mismo se ha reportado que Cu(II) interrumpe la función de proteínas Fe-S por desplazamiento del Fe causado por este metal[27]. Zn(II) por otra parte, aumenta la permeabilidad de la membrana a protones e interfiriendo de manera indirecta en la actividad de la F-ATPasa, siendo también un inhibidor de enzimas glicolíticas[28], además de estar relacionado con la competencia por el importe de otros metales esenciales como el Mn(II)[29].

La prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos ha incrementado una gran preocupación y estimulado esfuerzos para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos[30]. Una estrategia atractiva podría ser la reintroducción de antibióticos previa y actualmente en uso, a los cuales ciertas cepas sean resistentes, cuando se usan en combinación con otros agentes sensibilizantes[31].

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

El uso de los metales debido a sus propiedades antimicrobianas se practica desde la antigüedad en la historia de la especie humana. Diversas civilizaciones utilizaron estos conocimientos con diversos fines en el ámbito sanitario. Se tienen registros del uso de cobre en el antiguo Egipto para esterilización de heridas en el pecho y agua potable[22]. Así mismo, la plata se ha utilizado desde hace siglos, cerca del año 1000 A.C., para el tratamiento de heridas, así como para la potabilización del agua[32], por los años 400 A.C. cuando Hipócrates describió su uso para mejorar la curación de heridas y preservar agua y alimentos[33]. Ya en nuestra era existe una gran cantidad de compuestos y materiales con actividad antimicrobiana creados a base de metales de transición, tales como plata, zinc y cobre[34].

En un estudio realizado por Percival *et al.*[35] se describe el uso de iones de plata para el tratamiento de heridas por quemaduras, esto enfocado para observar su eficacia contra diversas bacterias resistentes a antibióticos, entre ellas MRSA y *E. coli* productora de β -lactamasas, a diferentes valores de pH.

Morones *et al.*[36] han reportado que la plata interrumpe múltiples procesos celulares en las bacterias, donde se incluye formación de enlaces disulfuro, homeostasis del hierro e interrupción del metabolismo, estos cambios conllevan a la formación de especies reactivas de oxígeno e incremento en la permeabilidad de la membrana.

Diversos estudios se han realizado sobre los efectos antimicrobianos de la plata y otros metales. Se han visto estudios como el reportado por Kim *et al.*[37] con cerámicas antimicrobianas con iones Ag(I), Cu(II) y Zn(II), donde se encontró buena actividad contra *E. coli* para las cerámicas con iones plata, pero no obtuvieron buenos resultados con los iones cobre y zinc.

Marks *et al.*[31] reportaron usar un complejo proteína-lípido proveniente de leche materna con actividad antitumoral y bactericida para revertir la resistencia de cepas de *S. aureus* resistente a metilicina, proponiendo un mecanismo de despolarización de membrana por influjo de iones calcio y disipación de la fuerza protón motriz.

Las infecciones por bacterias resistentes nos han forzado a volver al uso de agentes antimicrobianos antiguos que ya han sido descartados[38]. Debido a esto, se estima que en la próxima década se incrementen los estudios sobre el desarrollo de agentes antimicrobianos basados en metales[20]

Walkenhorst *et al.*[39] han reportado el uso de diversos iones, entre ellos Zn(II), Cu(II) y F⁻, así como el agente quelante EDTA como adyuvantes en terapias combinatorios con péptidos antimicrobianos catiónicos, encontrando buena aditividad y sinergia a las concentraciones utilizadas.

Morones *et al.*[36] demostraron por medio de estudios *in vitro* que la habilidad de la plata para causar estrés oxidativo puede potenciar la actividad de los antibióticos, que bacterias Gram-negativas pueden ser susceptibles a antibióticos específicos para Gram-positivas, como la vancomicina, además de que potencia la actividad del antibiótico contra bacterias persistentes y biofilms.

Así, recientemente se han desarrollado diferentes estudios para observar el incremento de la acción antimicrobiana de una variedad de antibióticos utilizando metales de transición[40-42], tanto micronutrientes como los considerados metales traza, logrando obtener resultados favorables para futuras perspectivas.

En nuestro grupo de investigación se realizaron anteriormente diversas pruebas donde se utilizaron algunos metales de transición con cercanía a la plata en la tabla periódica, con el objetivo de encontrar cierta tendencia a poseer efecto antimicrobiano, y se encontró que los metales de transición de los incluidos en el estudio poseen el efecto inhibitorio del crecimiento microbiano que buscamos utilizando bajas concentraciones (datos no publicados). También se encontró que combinaciones de iones de estos metales con iones de plata, en concentraciones no letales, menores a sus respectivas CMI, poseen un efecto inhibitorio sobre *E. coli*, así como un efecto bactericida cuando estas combinaciones se utilizan a las concentraciones en que los metales por separado presentaron el efecto inhibitorio.

Esto nos da la pauta para suponer que diversos metales de transición, en cercanía posicional a la plata en la tabla periódica, a bajas concentraciones

poseen la capacidad de mejorar el efecto del antibiótico a concentraciones subletales para la bacteria. Así en el presente estudio se abordará la estrategia presentada anteriormente, el uso de agentes adyuvantes, en nuestro caso usando iones de metales de transición en combinación con antibióticos, con el objetivo de observar la existencia de alguna combinación que nos permita re-sensibilizar a una cepa bacteriana resistente al efecto del antibiótico contra el que presenta la resistencia.

CAPÍTULO 3

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La acción combinada de metales de transición, cobre, zinc, níquel, cadmio o cobalto, a concentraciones sub-letales para los microorganismos con antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos o fluoroquinolonas re-sensibilizarán a bacterias resistentes.

3.2 Objetivo General

Realizar un screening para detectar los ensayos combinatorios que nos permitan alcanzar re-sensibilización de las bacterias resistentes a alguno de los antibióticos a probar.

3.3 Objetivos Específicos

1. Realizar una cinética decrecimiento de las cepas bacterianas a utilizar para identificar el tiempo en el cual el microorganismo llega a la fase de crecimiento exponencial.
2. Realizar screening de diferentes metales de transición (Cu(II), Cd(II), Co(II), Ni(II), Zn(II)), en combinación con los antibióticos a estudiar (ampicilina, meticilina, ciprofloxacino, kanamicina) para seleccionar el ensayo combinatorio que presente los mejores resultados para el estudio.
3. Obtener cepas bacterianas de *E. coli* u otras bacterias resistentes a antibióticos.
4. Realizar las pruebas de re-sensibilización con los ensayos combinatorios que mostraron el mejor efecto antimicrobiano en la etapa anterior.
5. Sentar las bases para el desarrollo de futuros estudios que permitan una estimación/propuesta de los mecanismos de acción que estén causando la re-sensibilización de los antibióticos en las bacterias resistentes.

CAPÍTULO 4

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales, reactivos y equipo

Para las diversas pruebas a realizar en el presente proyecto se utilizó el siguiente material: Cajas Petri de vidrio marca KIMAX, matraces Erlenmeyer 125, 250 y 500 mL marca JENAerGLAS, tubos para cultivo marca HACH, tubos de ensayo de 15 y 50 mL marca Corning, Placas de 96 pocillos marca Corning, celdas para espectrofotómetro de 10 mm marca Brand, micropipetas de 2-20, 20-200 y 100-1000 μL con sus respectivas puntillas marca Eppendorf, frascos de 40 mL de vidrio con rosca, tubos para microcentrífuga de 1.5 mL marca Expell.

De los reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto se utilizaron: medios de cultivo LB, Miller (Difco), TSB (BD, Bioxon), agar bacteriológico (BD, Bioxon). Las sales de metales utilizadas son $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ proporcionadas por el almacén general de reactivos de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Los antibióticos utilizados son ampicilina, meticilina, kanamicina y ciprofloxacino

(Sigma-Aldrich). Solución de lisis I (5 mL de Tris-HCL 1M y 4 mL de EDTA 0.5M en 200 mL H₂O destilada), Solución de lisis II (4 mL NaOH 10N y 2 g de SDS en 200 mL de H₂O destilada), Solución de lisis III (58.8g de acetato de potasio y 23 mL de ácido acético en 200 mL de H₂O destilada). Gel de agarosa de 0.8% para DNA plasmídico[43].

Los siguientes equipos, que se encuentran en los laboratorios de Biotecnología 2 y 3 ubicados en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, se utilizaron para el desarrollo de las pruebas incluidas en el presente estudio: incubadora estática y con agitación, balanza analítica, campana de flujo laminar, autoclave, refrigerador y congelador Norlake, espectrofotómetro Optizen 2120 UV Plus, lector de placas Multiskan GO (Thermo Scientific), cámara de electroforesis y fuente de poder Labnet.

4.2 Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se obtuvieron por cortesía del laboratorio de Biotecnología 1 de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL. Para la obtención de las cepas resistentes se transformaron estas mismas con plásmidos pUC57 y pGEX4T2 con resistencia a los antibióticos utilizados, véase anexo 1.

Todas las pruebas realizadas con *E. coli* se realizaron en medio LB, Miller (Difco), mientras que las pruebas con *S. aureus* se realizaron en medio TSB (BD, Bioxon).

4.3 Identificación de la fase de crecimiento exponencial de las cepas bacterianas a utilizar

Para identificar a qué tiempo la cepa comienza su fase de crecimiento exponencial se preparó un cultivo overnight, a partir de una colonia en cultivo sólido de agar LB (25 g/L LB Broth, Miller, Difco y 20 g/L agar bacteriológico, BD Bioxon) se tomó una asada (de una colonia aislada), se inoculó en un tubo con 5 mL de medio fresco y se dejó incubando por 16-20 horas a 37°C y 150 rpm.

Del cultivo overnight se realizó una dilución 1:250, inoculando 100 µL en un matraz con 25 mL de medio fresco, el cual se dejó incubar a 37°C y 150 rpm, de este cultivo se tomó muestra a las 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6 y 7 horas para medir su densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) en un espectrofotómetro Optizen 2120 UV Plus.

4.4 Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de los metales de transición y antibióticos incluidos en el estudio

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias se desarrolló tomando como base la metodología reportada por NCCLS[44] y Andrews[45] con algunas modificaciones, llevando a cabo los ensayos para los metales de transición, zinc, cobre, cobalto, níquel y cadmio, en placas de 96 pocillos con fondo plano Costar (Corning), tomando la CMI como la concentración más baja a la cual no se observa crecimiento.

Se prepararon soluciones madre de cada metal de transición a utilizar, de concentración 100 mM a partir de sus sales, siendo estas $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Esto se realizó en condiciones de asepsia, en frascos de 30 mL, a un volumen final de 25 mL usando agua desmineralizada y estéril, por último, estas soluciones se esterilizaron por filtración con filtros de 0.2 μm .

Una vez preparadas estas soluciones, en el primer pocillo de prueba se agregó la cantidad necesaria de cada metal para lograr una concentración de 16 mM en un volumen final de 200 μL , utilizando medio fresco para completar el volumen. A partir de éste se realizaron las diluciones correspondientes, tomando 100 μL de cada pocillo y pasándolos al siguiente, logrando que la siguiente concentración fuera 1/2 de la anterior, se repitió este último paso las veces necesarias para que las concentraciones a probar de cada metal sean 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 y 0.0156 mM, una vez agregados los 100 μL del inóculo.

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de los antibióticos a probar, ampicilina, kanamicina, ciprofloxacino y meticilina, se realizaron siguiendo las indicaciones de la NCCLS[44] y Andrews[45], con algunas modificaciones, llevando a cabo los ensayos en placas de 96 pocillos de fondo plano Costar (Corning), tomando como CMI concentración más baja a la cual no se observa crecimiento.

Las soluciones madre se prepararon según las recomendaciones de los proveedores, obteniendo 1 mL de soluciones 50 mg/mL de ampicilina,

kanamicina y meticilina, y de 25 mg/mL de ciprofloxacino. A partir de estas soluciones, en el primer pocillo de cada prueba se agregó la cantidad necesaria para lograr una concentración de 1024 ppm en un volumen final de 200 μ L. Posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes, tomando 100 μ L de cada pocillo y pasándolos al siguiente, logrando que la siguiente concentración fuera 1/2 de la anterior, se repitió este último paso las veces necesarias para que las concentraciones a probar de cada antibiótico sean 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015, 0.007, 0.003, 0.0019 y 0.0009 ppm una vez agregados los 100 μ L del inóculo.

Para inocular cada pocillo de prueba con *E. coli* o *S. aureus* se dejó crecer un cultivo overnight (cultivo de 16 h) a 37°C-150 rpm en su medio correspondiente (sección 4.2), de este cultivo se realizó una dilución 1:250 en medio fresco y se dejó crecer hasta una OD₆₀₀ de 0.20 \pm 0.02, ajustando con medio fresco en caso de ser necesario, con el fin de alcanzar una concentración celular aproximada de 10⁷ células/mL, corroborado por cuenta viable. Posteriormente se realizó una dilución 1:100 del cultivo ajustado en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL con medio fresco y al final se agregaron 100 μ L (1:2) de esta dilución para dar una concentración final \sim 10⁵ células/mL en un volumen final de 200 μ L en cada pocillo de prueba y se dejó incubar a 37°C-150rpm por 20 horas.

Cada prueba para determinar la CMI se realizó por triplicado con sus correspondientes controles de crecimiento y esterilidad.

4.5 Realización de pruebas combinatorias metal-antibiótico en cepas sensibles a los antibióticos incluidos en el estudio

Los ensayos checkerboard[46, 47] se desarrollaron a partir de las concentraciones mínimas inhibitorias de cada metal y antibiótico, se probaron en combinaciones de 0, 1/2, 1/4, y 1/8 de CMI para ver la interacción entre cada componente, en placas de 96 pocillos con fondo plano Costar (Corning). En el eje de las x (columnas) se colocaron las diferentes fracciones de la CMI del antibiótico, y en el eje de las y (filas) se colocaron las diferentes fracciones de la CMI del metal determinados para cada prueba.

Se prepararon diluciones de cada metal de transición y de cada antibiótico con medio fresco, en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, con el fin de que, al agregar las cantidades necesarias a cada pocillo en la placa, se logre la fracción de la concentración mínima inhibitoria a utilizar en cada una de las combinaciones metal-antibiótico.

Para las concentraciones a utilizar de cada metal de transición se agrega de manera horizontal, 8 μ L en cada pocillo de la segunda fila para lograr 1/8 de la CMI, 16 μ L en cada pocillo de la tercer fila para lograr 1/4 de la CMI y 32 μ L en cada pocillo de la cuarta fila para lograr 1/2 de la CMI. Para las concentraciones a utilizar del antibiótico se agrega de manera vertical, 8 μ L en cada pocillo de la segunda columna para lograr 1/8 de la CMI, 16 μ L en cada pocillo de la tercer columna para lograr 1/4 de la CMI y 32 μ L en cada pocillo de la cuarta columna para lograr 1/2 de la CMI, figura 4. Se coloca la cantidad restante de medio fresco para completar 180 μ L y se procede a agregar el inóculo.

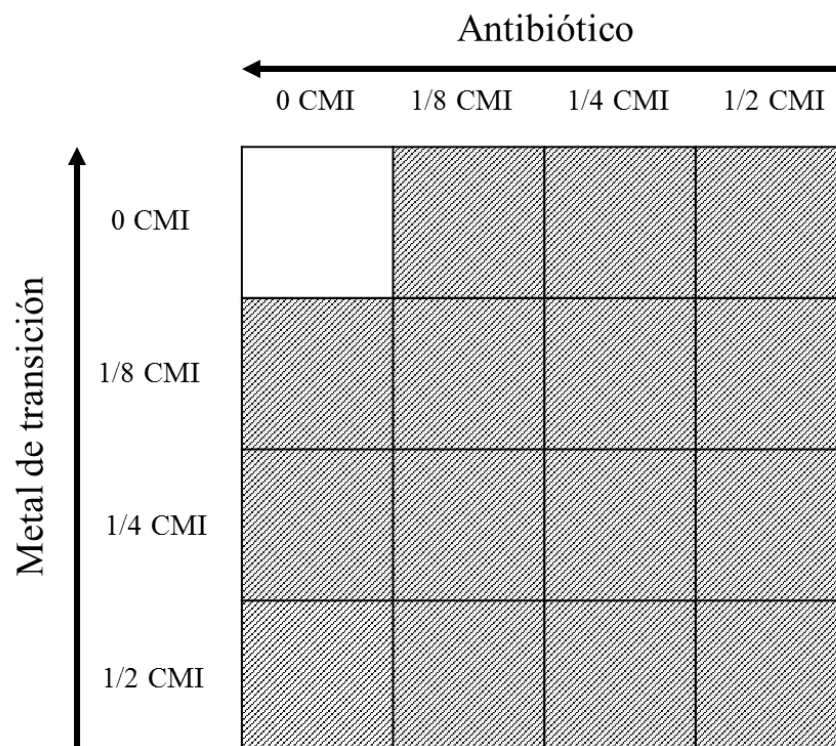


Figura 4. Combinaciones de prueba típicas para ensayos checkerboard de un componente x (antibiótico) y un componente y (metal de transición). El recuadro blanco indica el cultivo control y los recuadros con sombra indican los pocillos de prueba.

Para inocular cada pocillo de prueba con *E. coli* o *S. aureus* se dejó crecer un cultivo overnight a 37°C-150 rpm en su medio correspondiente (sección 4.2), de este cultivo se realizó una dilución 1:250 en medio fresco y se dejó crecer hasta una OD₆₀₀ de 0.2±0.02, ajustando con medio fresco en caso de ser necesario, con el fin de alcanzar una concentración celular aproximada de 10⁷ células/mL, corroborado por cuenta viable. Se realizó una dilución 1:20 en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con medio de cultivo fresco y al final se agregaron 20 µL (1:10) de esta dilución a cada pocillo de prueba, con el fin de lograr una concentración celular de ~10⁵ células/mL en 200 µL como volumen final y se dejó incubar a 37°C-150 rpm por 16-20 horas.

Cada prueba se realizó por triplicado, con sus correspondientes controles de crecimiento y esterilidad. La lectura de las placas para el análisis de los resultados se llevó a cabo por espectrofotometría en un lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific).

4.6 Pruebas de sensibilización a antibióticos en cultivos en fase estacionaria de crecimiento

Con el fin de conocer si los metales de transición utilizados para este estudio poseen la capacidad de sensibilizar a la bacteria en un estado de crecimiento donde el antibiótico por sí solo no posee, debido a su mecanismo de acción, la capacidad de influir de manera significativa sobre el crecimiento y/o la supervivencia de la misma se desarrolló la siguiente metodología, tomando como base la mencionada anteriormente para las pruebas de CMI y checkerboards.

Se realizaron ensayos checkerboard metal-antibiótico, en placas de poliestireno de 96 pocillos, haciendo combinaciones de 1/2, 1 y 2 CMIs de cada componente, seleccionando para este estudio aquellos metales que presentaron sinergia con ampicilina y/o metilicina.

Se prepararon, en caso de ser necesario, las diluciones de los metales y/o antibióticos en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL con medio de cultivo fresco que se requieran para lograr las concentraciones deseadas en cada pocillo de prueba. Para las concentraciones a utilizar del metal se agrega de manera horizontal, 8 µL en cada pocillo de la segunda fila para lograr 1/2 de la CMI, 16

μL en cada pocillo de la tercera fila para lograr 1 CMI y 32 μL en cada pocillo de la cuarta fila para lograr 2 CMI. Para las concentraciones a utilizar del antibiótico se agrega de manera vertical, 8 μL en cada pocillo de la segunda columna para lograr 1/2 de la CMI, 16 μL en cada pocillo de la tercera columna para lograr 1 CMI y 32 μL en cada pocillo de la cuarta columna para lograr 2 CMI.

Posteriormente se lleva a un volumen final de 200 μL agregando la cantidad faltante de un cultivo overnight, se dejó incubar a 37°C-150 rpm por 5 horas. Se tomaron muestras para el análisis de este estudio, a tiempo de 0 horas y a tiempo de 5 horas, realizando 5 diluciones en series de 10, iniciando con una dilución 1:100, se inocularon 10 μL de cada dilución en placas Petri con agar LB, con el fin de realizar un conteo de células viables, incubándolas a 37 °C por 24 horas.

4.7 Obtención de cepas resistentes a los antibióticos utilizados para el estudio

Para llevar a cabo la transformación por electroporación de las cepas con plásmidos que confieran la resistencia al antibiótico deseado se realizaron diversas metodologías tomando como base las descritas por Sambrook[43] con algunas modificaciones.

4.7.1 Preparación y transformación de bacterias electro-competentes

Se utilizó un cultivo overnight, obtenido como se ha descrito anteriormente, para inocular un matraz con 20 mL de medio fresco, se incubó a 37°C-150 rpm hasta una OD₆₀₀ de 0.3-0.4. Se transfiere el cultivo a un tubo de 50 mL y se centrifugó a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados a 14000 rpm por 1 minuto, en el primero re-suspendiendo el paquete celular en 1 mL mQH₂O, en el segundo con 500 mL de mQH₂O, descartando el sobrenadante en cada lavado, y por último re-suspendió el paquete celular en 50 µL de glicerol estéril al 10% frío, manteniendo las células en un baño de agua fría a 4°C hasta su uso.

Para la electroporación al cultivo electro-competente preparado en glicerol al 10% se le agregó aproximadamente 1 µg del plásmido correspondiente, dejando reposar por 1 minuto. Se agregó todo a una celda de electroporación de 0.2 cm y se realizó la electroporación a 2500 V. Inmediatamente después se agregó 1 mL de medio fresco a la celda y se transfirió a un tubo de 1.5 mL para su incubación a 37°C-300rpm en termomixer Eppendorf. Se inocularon alícuotas de este último cultivo en cajas Petri con agar LB con el antibiótico correspondiente.

4.7.2 Selección de bacterias transformadas y extracción de DNA plasmídico

Después del tiempo de incubación se seleccionaron las colonias aisladas que crecieron en el agar con el antibiótico acorde a la resistencia de cada cepa

bacteriana según el plásmido incorporado transfiriendo una asada a un tubo con 5 mL de medio fresco para su correspondiente almacenamiento y preservación.

Al seleccionar las colonias que crecieron en el agar con antibiótico, se llevó a cabo una extracción del DNA plasmídico con el fin de corroborar la integración del mismo, tomando como guía la metodología de Sambrook[43] con algunas modificaciones.

De un cultivo overnight se centrifugó 1 mL a 14000 rpm por 1 minuto y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 200 μ L de la solución de lisis I, se homogenizó y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se agregaron 200 μ L de la solución de lisis II, se homogenizó y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente; se agregaron 200 μ L de la solución de lisis III y se dejó reposar por 5 minutos en hielo para finalmente centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregó 1 mL de etanol absoluto y se incubó a -20 °C por 30-45 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 200 μ L de etanol al 70%, se homogenizó en vortex y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos, retirando el sobrenadante cualitativamente con micropipeta después de centrifugar para dejarse secar a 37°C en incubadora.

Una vez seco se adicionaron 20 μ L de mQH₂O y se re-suspendió en vortex. Se analizaron por electroforesis empleando un gel de agarosa al 0.7% utilizando buffer TAE al 1X para correr la electroforesis, usando una mezcla de 1.5 μ L de jugo azul, 1.5 μ L de GelRed y 3-5 μ L de cada muestra, para ser

observado en transluminador Labnet a 302 nm donde se espera observar la banda correspondiente al plásmido incorporado

4.8 Identificación de concentraciones mínimas inhibitorias para las cepas resistentes a antibióticos obtenidas

Para la determinación de las CMI de las cepas resistentes se utilizó la misma metodología que para las cepas sensibles, descrita anteriormente, modificando únicamente las concentraciones a probar de los antibióticos. Se utilizaron los mismos antibióticos que en las pruebas anteriores.

4.9 Realización de pruebas combinatorias metal-antibiótico para re-sensibilización a antibióticos en las cepas resistentes obtenidas

De manera similar que para la determinación de las nuevas CMI, los ensayos checkerboard se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita anteriormente, utilizando los mismos antibióticos y las mismas sales de metales de transición que para las pruebas realizadas con las cepas sensibles a los antibióticos, modificando únicamente las concentraciones a probar de los antibióticos, ajustando a la CMI correspondiente.

4.10 Análisis de datos

Los datos se analizaron mediante la prueba de ANOVA y LSD de Fisher utilizando el software Microsoft Excel 2013, con el objetivo de observar diferencias significativas entre los resultados. Se tomaron como resultados favorables al estudio aquellas combinaciones metal-antibiótico que causen un mínimo de 80% de inhibición sobre el cultivo en fase de crecimiento exponencial. Las interacciones fueron analizadas según la fórmula de sinergia reportada por Hegreness *et al*[48], donde se obtendrá sinergia cuando el efecto combinado de los agentes antimicrobianos sea mayor que el predicho a partir de sus efectos individuales, siendo este valor calculado como la diferencia entre el valor predicho de los dos agentes antimicrobianos y el obtenido bajo las condiciones de combinación, definido por la siguiente ecuación:

$$\text{Fórmula 1 } S = (f_{x0}/f_{00})(f_{0y}/f_{00}) - f_{xy}/f_{00}$$

Donde: f_{x0} = tratamiento A, f_{0y} = tratamiento B, f_{xy} = tratamiento A+B, f_{00} = control; y siendo $S > 0$ Sinérgico, $S = 0$ Aditivo y $S < 0$ Antagónico.

4.11 Manejo y disposición de residuos

Los residuos generados durante la realización del proyecto de investigación fueron gestionados de acuerdo a las características de los mismos, siguiendo los lineamientos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas utilizando los recipientes proporcionados por este departamento, en base a la Norma PR-CLB-SRR-000.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS

5.1 Curva de crecimiento de *E. coli* en medio LB (Miller)

Con el fin de identificar la fase de crecimiento exponencial de la cepa de *E. coli* ATCC 11229, se realizó un cultivo bajo las condiciones antes mencionadas y se determinó la de absorbancia a una OD₆₀₀ (véase sección 4.3), y una vez identificada esta fase se realizó un cultivo en fase sólida (agar LB) para llevar a cabo el conteo de colonias a la densidad óptica seleccionada.

Como se puede observar en la figura 5, la fase temprana de crecimiento exponencial o logarítmica para la cepa de *E. coli* ATCC 11229 utilizada comienza a partir de las 2.5 h, cuando se alcanza una densidad óptica aproximada de 0.2 unidades de absorbancia a 600 nm. Esta densidad óptica de *E. coli* equivale a una concentración celular de $\sim 10^7$ células/mL, corroborada por un conteo de células vivas en placas de agar LB.

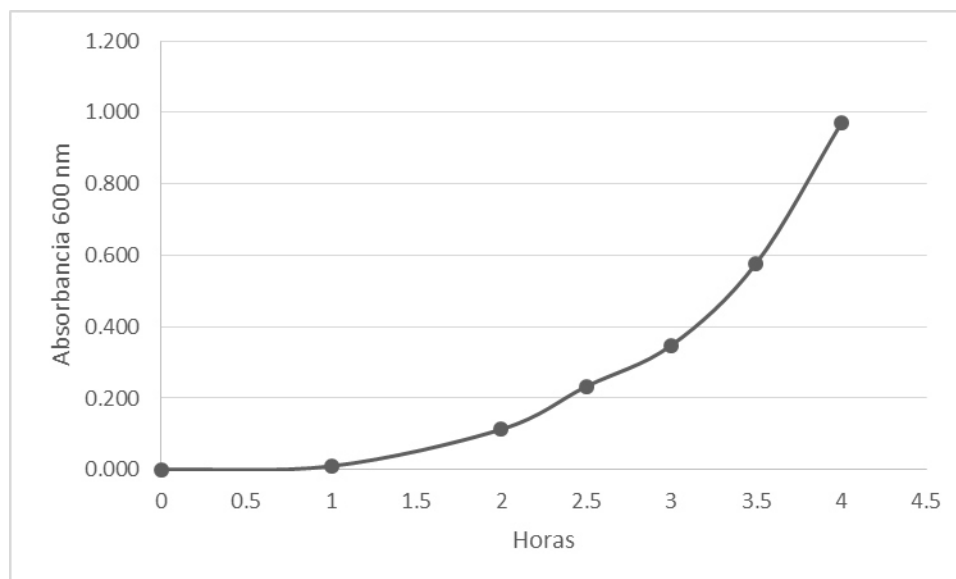


Figura 5. Crecimiento de *E. coli* ATCC 11229. OD₆₀₀ de un cultivo de *E. coli* con respecto al tiempo en horas del inóculo 1:250 en medio LB a 37°C-150 rpm.

5.2 Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias de los metales de transición y antibióticos

Una vez identificada la densidad óptica donde comienza la fase de crecimiento exponencial se llevaron a cabo los ensayos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Estas se encuentran resumidas en la tabla 2, tanto para los metales de transición utilizados como para los antibióticos con las cuales se busca el efecto sensibilizador favorable para este estudio. Además se puede observar que las CMI's correspondientes a los metales de transición se encuentran dentro de un rango cercano entre ellas. En el caso del antibiótico β -lactámico metilicina, debido a que la cepa utilizada para el estudio no mostró sensibilidad a éste, se optó por eliminarla del plan de trabajo en los ensayos siguientes

Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>E. coli</i> ATCC 11229		
Compuesto	CMI (mM)	CMI (ppm)
Cd ²⁺	1	-
Zn ²⁺	2	-
Ni ²⁺	2	-
Co ²⁺	1	-
Cu ²⁺	8	-
Ampicilina	-	32
Kanamicina	-	32
Ciprofloxacino	-	0.03
Meticilina	-	>512
Concentraciones mínimas inhibitorias de los metales de transición y antibióticos utilizados en este trabajo.		

5.3 Comportamiento de cultivos en fase de crecimiento exponencial de *E. coli* ATCC 11229 en combinaciones metal-antibiótico

Una vez determinada la concentración mínima inhibitoria de cada uno de los compuestos a utilizar en este estudio, se procedió a realizar las pruebas combinatorias mediante ensayos checkerboard. Se probaron combinaciones de Cd(II), Zn(II), Ni(II), Co(II) y Cu(II) con ampicilina, kanamicina y ciprofloxacino, a concentraciones de 1/2, 1/4 y 1/8 de su correspondiente CMI, resultando en un total de 9 combinaciones para cada par metal-antibiótico.

Se obtuvieron buenas interacciones para los antibióticos ampicilina y kanamicina, donde cuatro de los cinco metales incluidos en el estudio mostraron porcentajes altos de inhibición al combinarse con estos antibióticos. Mientras que las combinaciones con la fluoroquinolona ciprofloxacino no mostraron interacción inhibitoria con ningún metal, por lo que se descartó de los experimentos siguientes para este estudio.

Cobre: En los ensayos realizados combinando cobre y kanamicina se lograron porcentajes de inhibición mayores a los que causan estos dos

componentes por separado, tal como se observa en la figura 6a. Podemos tener especial interés en dos de estas combinaciones, que resultan de combinar 1/2 de la CMI de cobre con 1/2 y 1/4 de la CMI de kanamicina, logrando un porcentaje de inhibición de 86.07% y 89.29%, respectivamente, los cuales son significativamente diferentes ($p < 0.05$) a sus controles correspondientes. Además, al combinar 1/8 de la CMI de kanamicina con las diferentes concentraciones de cobre se logra un efecto inhibitorio muy cercano al que se alcanza al exponer a *E. coli* únicamente a un 1/2 de la CMI de kanamicina, encontrando que estas combinaciones no son diferentes significativamente con respecto al efecto que causa el antibiótico a esta última concentración, pero sí significativamente diferentes ($p < 0.05$) en relación a los efectos que causarían por sí mismos a sus respectivas concentraciones.

Para los ensayos cobre-ampicilina se observa que el metal es capaz de potenciar los efectos inhibitorios de este antibiótico. Se logran observar altos porcentajes de inhibición a diferentes combinaciones, figura 7a, a diferencia del efecto que causa con la kanamicina, donde se logra ver un aumento del efecto inhibitorio conforme aumenta la concentración de uno de los dos componentes. Se obtiene un efecto inhibitorio de 84.97% al combinar 1/8 de la CMI del metal con 1/2 de la CMI del antibiótico, así como 74.34% y 70.87% de inhibición al combinar 1/2 de la CMI de cobre con 1/4 y 1/2 de la CMI de ampicilina, respectivamente, siendo estas tres combinaciones significativamente diferentes ($p < 0.05$) a los efectos que causan cada componente por separado a esas concentraciones.

Zinc: Al realizar las combinaciones zinc-kanamicina se observa que se obtienen buenos efectos de inhibición sobre el cultivo de *E. coli*, figura 6b, logrando una inhibición casi completa, 99.15%, al estar en contacto con 1/2 de la CMI tanto del metal como del antibiótico, así como inhibiciones de 73.17% y 79.09%, al combinar 1/2 de CMI del metal con 1/4 de CMI de antibiótico, y 1/4 de CMI de metal con 1/2 de CMI de antibiótico respectivamente, siendo todas estas concentraciones diferentes significativamente ($p < 0.05$) con respecto a los efectos que causan cada componente por si solo a las concentraciones especificadas. Podemos observar que los efectos inhibitorios van en aumento conforme se incrementa la concentración de uno de los dos componentes. A su vez se encontró un efecto similar al observado con las combinaciones cobre-kanamicina, donde la combinación de 1/2 y 1/8 de la CMI de zinc y kanamicina, respectivamente, logra una inhibición mayor (65.09%) y significativamente diferente ($p < 0.05$) a la obtenida en este caso al exponer la bacteria a 1/2 de la CMI del antibiótico.

Al contrario de los efectos descritos anteriormente, al realizar las combinaciones zinc-ampicilina, se logra apreciar que estos dos componentes no poseen efecto alguno de potenciación sobre el efecto antimicrobiano que logran causar por sí mismos en ninguna de las nueve combinaciones, tal como se muestra en la figura 7b.

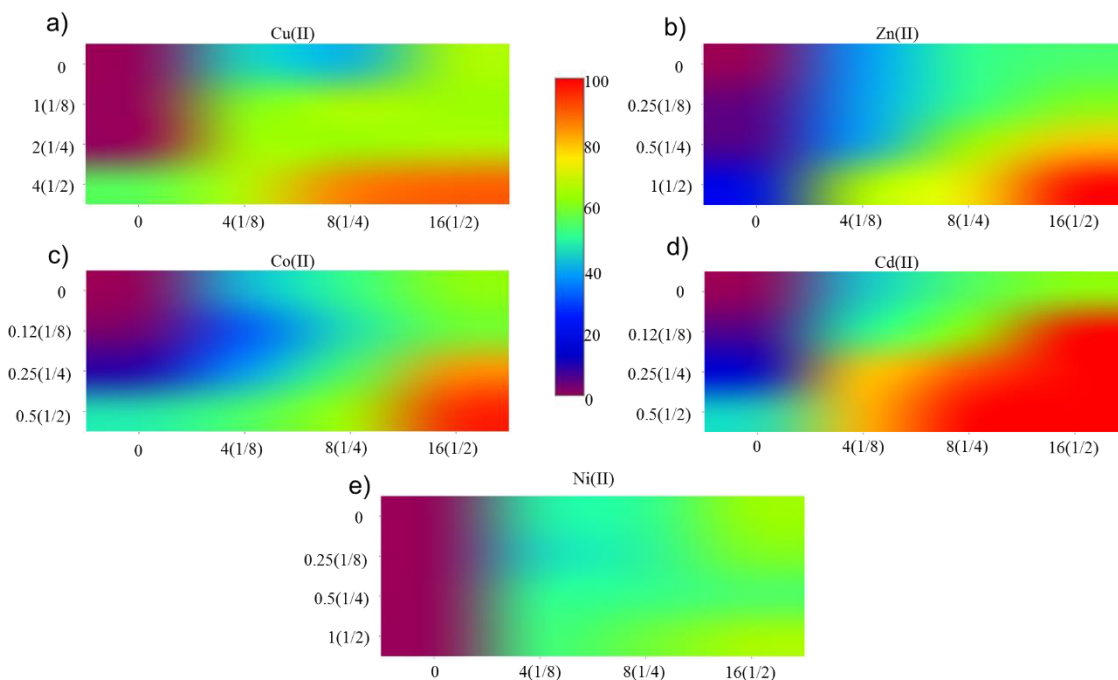


Figura 6. Efecto inhibitorio de kanamicina potenciado por metales en cepa de *E. coli* ATCC 11229 Mapas de calor de los porcentajes de inhibición de las combinaciones metal-kanamicina realizadas; la barra del centro indica el porcentaje de inhibición que representa el gradiente de colores; concentraciones de kanamicina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

Cobalto: Este metal presenta resultados similares a los dos antes mencionados. Se observa, tal como se aprecia en la figura 6c, que existe buena potenciación de los efectos inhibitorios de kanamicina, al combinar 1/2 de la CMI de este antibiótico con 1/4 y 1/2 de la CMI del metal, obteniendo porcentajes de inhibición de 84.06% y 95.83%, respectivamente, siendo además diferentes significativamente ($p < 0.05$) de los efectos que causan al cultivo de *E. coli* por sí mismos.

En el caso de las combinaciones realizadas con ampicilina, se observa un buen efecto de potenciación en todas las combinaciones (probadas en estos ensayos), aumentando en algunos casos al doble el efecto que causaría el antibiótico a las concentraciones ensayadas. Resultan de mayor interés aquellas

combinaciones que involucran el uso de $1/2$ de la CMI del antibiótico con las diferentes concentraciones del metal, obteniendo porcentajes de inhibición de 99.24%, 99.09% y 98.78% al colocar esta concentración de ampicilina con $1/8$, $1/4$ y $1/2$ de la CMI de cobalto, respectivamente, siendo estas diferentes significativamente a sus respectivos controles ($p < 0.05$) pero no entre ellas.

Cadmio: Tal como se observa en la figura 6d, las combinaciones cadmio-kanamicina muestran buen efecto inhibitorio, siendo este metal capaz de potenciar el efecto que causa el antibiótico. Se puede observar que aquellas realizadas con $1/2$ de la CMI de kanamicina logran una inhibición total del crecimiento de la cepa de *E. coli* utilizada en el estudio, logrando inhibir 99.76%, 99.94% y 100% del crecimiento al combinarse con $1/8$, $1/4$ y $1/2$ de la CMI de cadmio, respectivamente, mostrando diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a sus controles. Un efecto similar se alcanza con dos combinaciones de $1/4$ de la CMI de kanamicina, una con $1/4$ y otra con $1/2$ de la CMI de cadmio, las cuales logran inhibir 90.80% y 99.94% del crecimiento de *E. coli*, respectivamente, y son significativamente diferentes a sus controles. Además, se determinó que con excepción de la combinación de $1/8$ de la CMI tanto de cadmio como de kanamicina, todas las combinaciones resultan en un efecto inhibitorio mayor que el que causa el antibiótico por sí mismo a $1/2$ de su CMI.

De manera similar, el cadmio fue capaz de potenciar el efecto inhibitorio de la ampicilina, ya que, como se observa en la figura 7d, todas las combinaciones realizadas causan un aumento en el porcentaje de inhibición con respecto a sus respectivos controles, donde solo se tiene a la bacteria en

contacto con cadmio o con ampicilina. Se pudo determinar que los ensayos realizados al combinar 1/2 de la CMI de ampicilina con las diferentes concentraciones de cadmio logran, en el caso de las que contienen 1/2 y 1/4 de su CMI, una inhibición casi completa del crecimiento de *E. coli*, efecto muy parecido al que se observó en las combinaciones con kanamicina, mientras que aquella con 1/8 de la CMI de cadmio, a pesar de que no alcanza una inhibición tan próxima al 100% como las anteriormente mencionadas, logra un 83.66% de inhibición, siendo estas combinaciones significativamente diferentes ($p < 0.05$) a sus respectivos controles, donde solo uno de los componentes está en contacto con la bacteria.

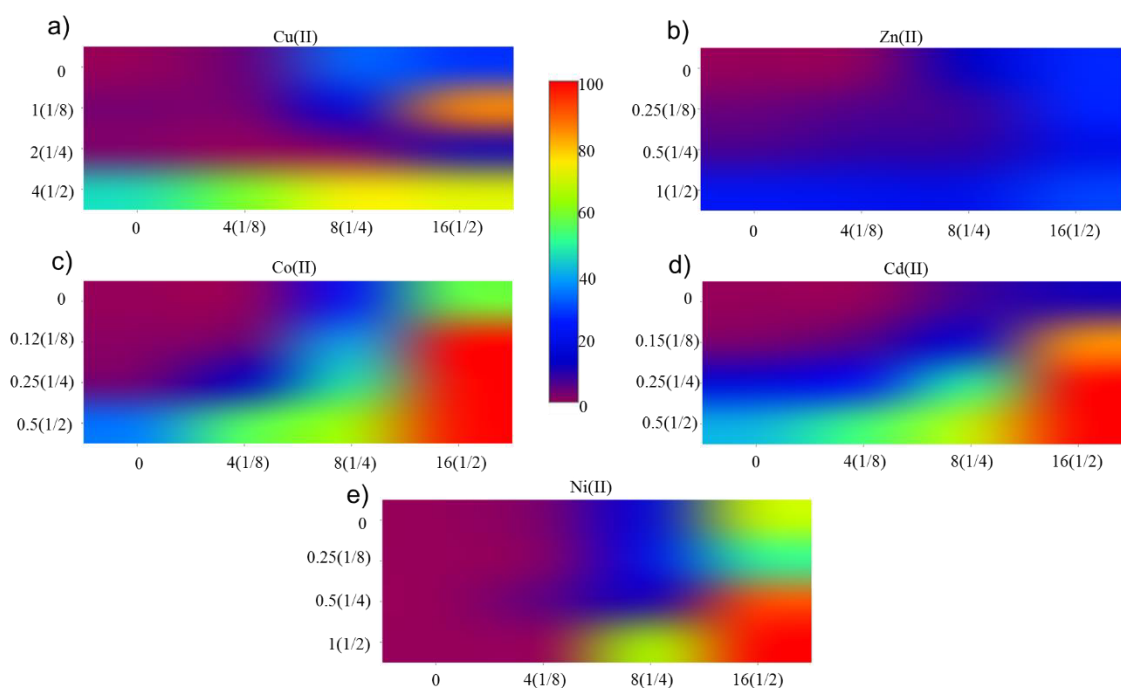


Figura 7. Efecto inhibitorio de ampicilina potenciado por metales en cepa de *E. coli* ATCC 11229. Mapas de calor de los porcentajes de inhibición de las combinaciones metal-ampicilina realizadas; la barra del centro indica el porcentaje de inhibición que representa el gradiente de colores; concentraciones de ampicilina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

Níquel: Lo que se puede observar de los resultados obtenidos al combinar este metal de transición con los antibióticos utilizados es que, similar a los resultados obtenidos con zinc, el níquel solo posee la capacidad de potenciar los efectos inhibitorios de ampicilina, ya que como se aprecia en la figura 6e, no se aprecia un incremento significativo de los efectos inhibitorios de kanamicina. Mientras tanto, en los ensayos realizados al combinar este metal con ampicilina, como se muestra en la figura 7e, se observa que no en todas las combinaciones se tiene el efecto de potenciar la inhibición causada por el antibiótico, obteniendo que solo aquellas que resultan de la interacción de 1/4 de la CMI de ampicilina con 1/2 de la CMI del metal, así como en aquellas donde 1/2 de la CMI del antibiótico se combinan con 1/4 y 1/2 de la CMI del níquel causan un aumento significativo ($p < 0.05$) de este efecto, causando una inhibición de 65.58%, 91.31% y 99.64% respectivamente.

5.4 Análisis de interacciones entre metales y antibióticos en cultivos en fase de crecimiento exponencial de *E. coli* ATCC 11229

De las combinaciones realizadas en la sección anterior, se tomaron los datos del crecimiento de *E. coli* y se aplicaron a la fórmula (1), obteniendo valores numéricos menores, iguales o mayores a cero, que corresponden a un efecto antagónico, aditivo o sinérgico, respectivamente, entre los componentes de cada combinación metal-antibiótico.

En la figura 8, se muestra que existe una tendencia a presentar efecto sinérgico aquellas combinaciones que involucran 1/2 de la CMI de al menos uno

de los componentes (metal o antibiótico), agrupándose estos resultados en la esquina inferior derecha de cada una de las representaciones. Se puede observar además, que en el caso de las combinaciones realizadas con cobalto, figura 8c, únicamente se presenta el efecto sinérgico al combinar 1/2 de la CMI de kanamicina con 1/2 y 1/4 de la CMI del metal, resultando antagónicas las demás combinaciones entre éstos.

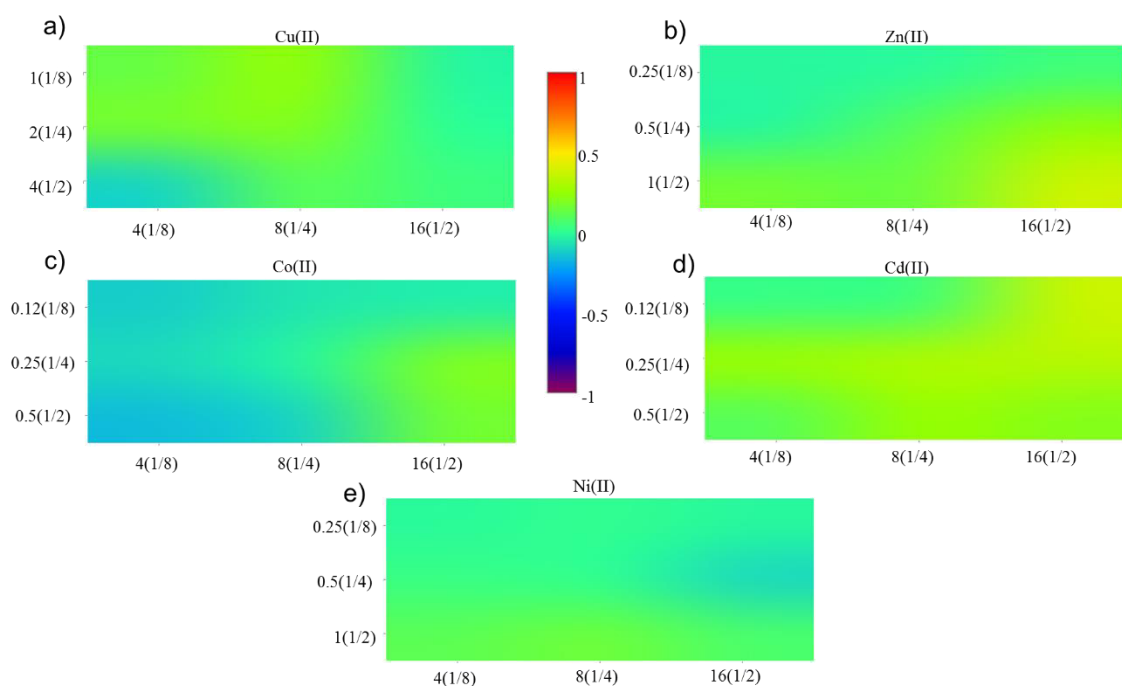


Figura 8. Tipo de interacción metal-kanamicina cepa de *E. coli* ATCC 11229. Mapas de calor del efecto antagónico (< 0), aditivo (= 0) o sinérgico (> 0) de las combinaciones metal-kanamicina realizadas; la barra el centro indica el grado de interacción que representa el gradiente de colores; concentraciones de kanamicina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

Para el caso de las combinaciones metal-ampicilina, figura 9, se aprecia una tendencia similar a la observada para las combinaciones metal-kanamicina, donde el efecto sinérgico se presenta cuando se tiene 1/2 de la CMI de uno de los componentes. Se puede observar una interacción aislada entre efectos antagónicos para las combinaciones cobre-ampicilina, la cual corresponde al porcentaje de inhibición más alto para estas combinaciones. En las combinaciones zinc-ampicilina, figura 9b, se observa que mayoritariamente los efectos entre estos son antagónicos, y aunque se presenta la tendencia de sinergia como en los demás metales, este efecto no logra causar una inhibición considerable, tal como se ve en la figura 7b.

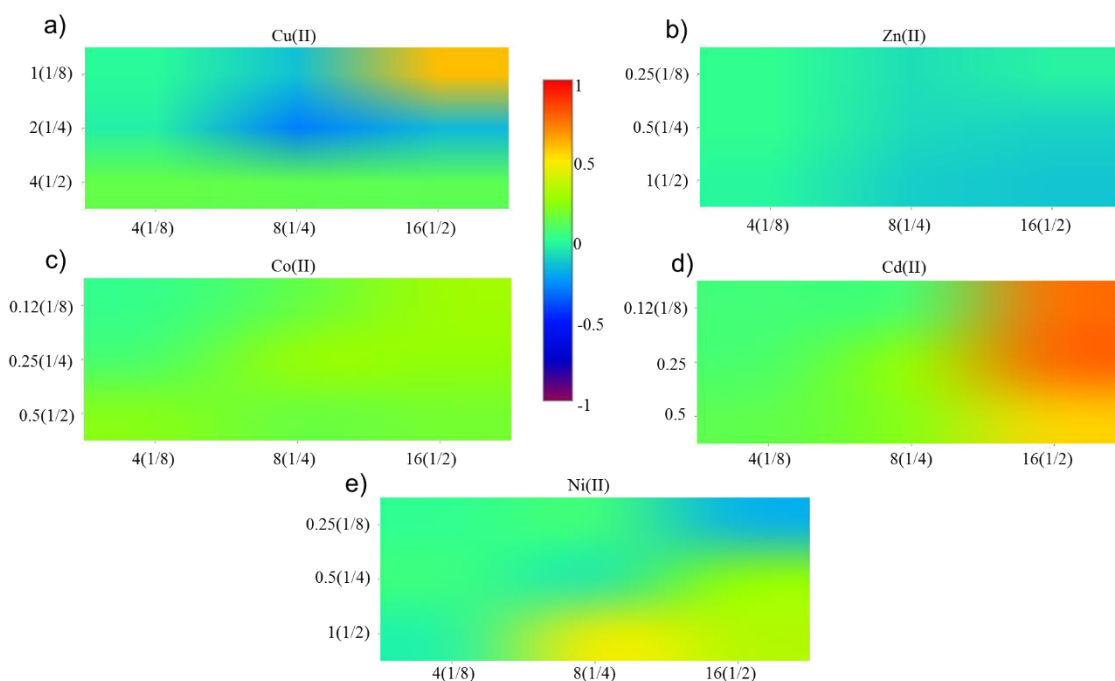


Figura 9. Tipo de interacción metal-ampicilina en cepa de *E. coli* ATCC 11229. Mapas de calor del efecto antagónico (< 0), aditivo (= 0) o sinérgico (> 0) de las combinaciones metal-ampicilina realizadas; la barra el centro indica el grado de interacción que representa el gradiente de colores; concentraciones de ampicilina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

5.5 Comportamiento de cultivos en fase estacionaria de *E. coli* ATCC 11229 en combinaciones metal-antibiótico

Ya que se observó que algunos de los metales (incluidos en este estudio) poseen la capacidad de potenciar el efecto inhibitorio de la ampicilina y la kanamicina, surge la pregunta si, debido a que el propio mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos no posee actividad inhibitoria del microorganismo en la fase estacionaria de crecimiento, estos son capaces de lograr algún efecto bactericida en esta etapa de crecimiento.

Se probaron los metales que causaron el efecto antes dicho en fase de crecimiento exponencial al combinarse con ampicilina, siendo estos níquel, cobalto, cobre y cadmio. La tabla 3 resume los resultados obtenidos para esta prueba, expresando para cada metal el logaritmo de UFC después del tiempo de prueba (cinco horas; tablas del lado izquierdo), y la diferencia, también expresada en logaritmo de UFC, de este con el control de crecimiento inmediatamente iniciada la prueba (tiempo de cero horas; tablas del lado derecho).

Se pudo determinar que, con el metal que se obtuvieron los mejores resultados de este efecto bactericida fue el cobre, el cual, además de poseer este efecto por sí solo en fase estacionaria de crecimiento, logra verse potenciado al estar en conjunto con el antibiótico β -lactámico, tal como se muestra en la tabla 3c. Se puede observar que los metales restantes no poseen un grado de efecto bactericida muy considerable, aunque poseen efecto bactericida por sí mismos al encontrarse al doble de su CMI, no se logra apreciar una potenciación

considerable de estos efectos una vez que son puestos en conjunto con el antibiótico.

a)				
Log UFC/mL				
Ni\Amp	0	16	32	64
0	9.14	9.25	8.83	8.79
1	9.38	9.09	8.80	9.02
2	9.13	8.86	9.22	9.41
4	8.30	9.03	9.04	8.39
b)				
ΔLog UFC/mL				
Ni\Amp	0	16	32	64
0	0.30	0.41	-0.01	-0.05
1	0.54	0.25	-0.04	0.18
2	0.29	0.02	0.38	0.57
4	-0.54	0.19	0.20	-0.45
c)				
Log UFC/mL				
Co\Amp	0	15	32	64
0	9.19	9.06	9.15	9.48
0.5	9.09	8.83	8.84	8.54
1	8.99	9.62	8.81	8.87
2	8.48	8.63	8.54	8.81
d)				
ΔLog UFC/mL				
Co\Amp	0	15	32	64
0	0.29	0.16	0.25	0.58
0.5	0.19	-0.07	-0.06	-0.36
1	0.09	0.72	-0.09	-0.03
2	-0.42	-0.27	-0.36	-0.09
e)				
Log UFC/mL				
Cu\Amp	0	16	32	64
0	9.30	9.33	9.30	9.27
4	8.39	8.31	8.39	7.15
8	5.45	5.65	0.00	0.00
16	0.00	0.00	0.00	0.00
f)				
ΔLog UFC/mL				
Cu\Amp	0	16	32	64
0	0.17	0.20	0.17	0.14
4	-0.74	-0.82	-0.74	-1.98
8	-3.68	-3.48	-9.13	-9.13
16	-9.13	-9.13	-9.13	-9.13
g)				
Log UFC/mL				
Cd\Amp	0	16	32	64
0	9.32	9.41	9.04	9.18
0.5	9.26	9.08	9.20	9.18
1	8.95	9.00	9.18	8.70
2	8.52	8.40	8.23	8.40
h)				
ΔLog UFC/mL				
Cd\Amp	0	16	32	64
0	0.12	0.21	-0.16	-0.03
0.5	0.05	-0.12	0.00	-0.03
1	-0.25	-0.20	-0.03	-0.51
2	-0.69	-0.81	-0.97	-0.81

Tabla 3. Efecto bactericida metal-ampicilina en cepa de *E. coli* ATCC 11229 en fase estacionaria de crecimiento. Efecto bactericida de las combinaciones metal-ampicilina en fase estacionaria; tablas de la columna izquierda indican la supervivencia en LogUFC/mL de *E. coli* en cada prueba; tablas de la columna derecha indican la diferencia de la supervivencia en LogUFC/mL en comparación con el control al iniciar la prueba; concentraciones de ampicilina (columnas) expresadas en ppm; concentraciones de metales (filas) expresadas en mM.

5.6 Obtención de *E. coli* resistente a ampicilina y kanamicina

Ya que se observaron los efectos que estos metales tienen sobre el crecimiento de la bacteria al estar en conjunto con un antibiótico se procedió a la obtención de las cepas resistentes a estos, transformándola con los plásmidos que le confieran tal característica, plásmidos incluidos en el anexo 1. En la tabla 4 se evidencia la obtención de las cepas de *E. coli* transformadas con el incremento de las CMI de cada antibiótico con respecto a la cepa susceptible

que se muestran en la tabla 2, mientras que la figura x muestra la presencia de plásmido en la cepa.

Tabla 4. Características de las cepas de <i>E. coli</i> transformadas			
Bacteria	Plásmido	Resistencia	CMI (ppm)
<i>E. coli</i> -Kan	pUC57-kan	Kanamicina	8 200
<i>E. coli</i> -Amp	pGEX4T2	Ampicilina	25 000

La concentración mínima inhibitoria especificada para cada cepa corresponde únicamente al antibiótico para el cual el plásmido confiere la resistencia.

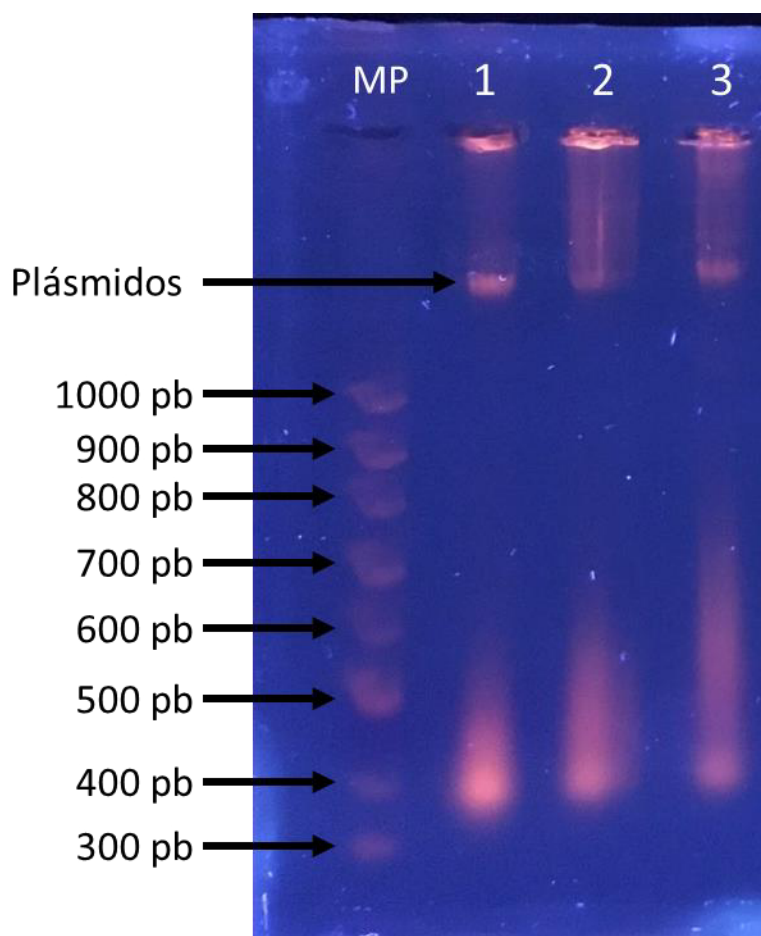


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa para las cepas de *E. coli*. Gel de electroforesis de la extracción de DNA plasmídico de las cepas de *E. coli* utilizadas; MP: marcador de peso molecular; 1: *E. coli* ATCC 11229; 2: *E. coli*-Amp; 3: *E. coli*-Kan.

5.7 Comportamiento de cultivos en fase de crecimiento exponencial de cepas transformadas de *E. coli* en combinaciones metal-antibiótico

Obtenidas las cepas de *E. coli* resistentes a ampicilina y kanamicina, e identificada su CMI correspondiente, se procedió a someter a estas nuevas cepas a los tratamientos combinatorios con los metales que lograron potenciar de manera significativa el efecto inhibitorio de cada antibiótico, realizando para cada uno de estos cuatro ensayos combinatorios, ya que se descarta el tratamiento combinatorio con níquel para kanamicina, y el zinc en los tratamientos correspondientes a ampicilina.

Cobre: Con este metal se apreciaron interacciones con una tendencia similar a las mencionadas anteriormente, como se puede observar en la figura 11a se aprecia una potenciación de los efectos inhibitorios de kanamicina al colocar 1/2 de la CMI de cada componente, obteniendo un 86% de inhibición, el cual es significativamente diferente ($p < 0.05$) del efecto que causa cada componente por separado.

En el caso de las combinaciones de este metal con ampicilina, se logra apreciar, figura 12a, la misma tendencia de potenciación del efecto. En este caso se puede observar que al combinarse 1/2 de la CMI de ampicilina con las distintas fracciones de la CMI del metal, se logra una potenciación significativa ($p < 0.05$) del efecto inhibitorio sobre la cepa de *E. coli* resistente al antibiótico, obteniendo porcentajes de inhibición de 84.92%, 89.94% y 75.52% con 1/8, 1/4 y 1/2 de la CMI de cobre, respectivamente.

Zinc: Debido a que este metal, según resultados de las etapas anteriores, no potencia el efecto inhibitorio causado por ampicilina, en esta fase solo se incluyó en las pruebas realizadas con kanamicina, tal como se aprecia en la figura 11b. Puede observarse que el efecto inhibitorio se incrementa en las combinaciones que involucran 1/2 de la CMI del metal, al igual que aquellas que involucran esta misma fracción de kanamicina. Puede apreciarse también que el efecto inhibitorio que se presenta al combinar 1/2 de la CMI de este metal con 1/8 de la CMI de kanamicina es el mismo ($p < 0.05$) que causa este último por sí solo a 1/2 de su CMI, mientras que al combinarse estos, ambos a 1/2 de su respectiva CMI, se logra un efecto mayor que los que causan las diferentes concentraciones del antibiótico ($p < 0.05$)

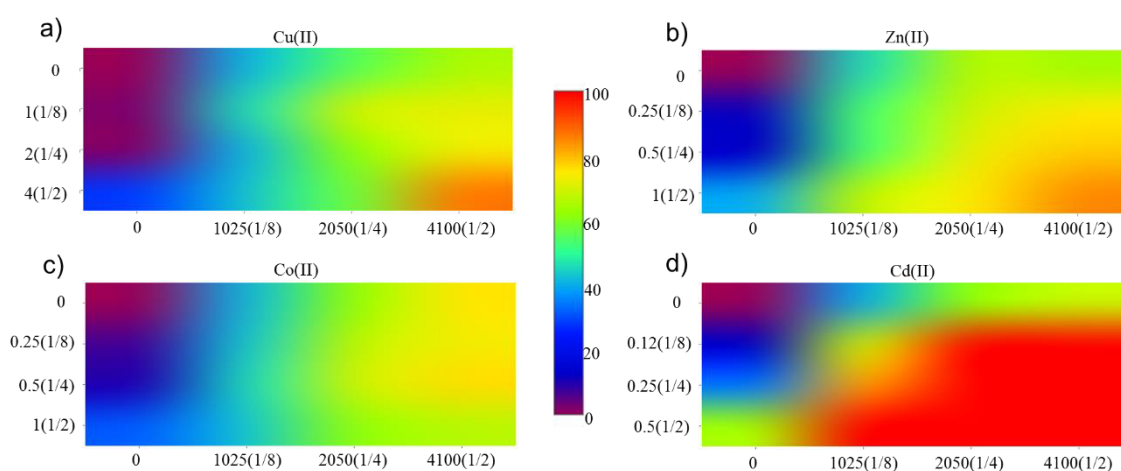


Figura 11. Efecto inhibitorio de kanamicina potenciado por metales en cepa de *E. coli* resistente a este antibiótico. Mapas de calor de los porcentajes de inhibición de las combinaciones metal-kanamicina realizadas; la barra del centro indica el porcentaje de inhibición que representa el gradiente de colores; concentraciones de kanamicina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

Cobalto: Para las pruebas realizadas al combinar este metal junto con los antibióticos en los cultivos de *E. coli* resistente a estos, se puede apreciar, figuras

11c y 2b, que no se presenta un aumento del efecto inhibitorio causado por las diferentes concentraciones que estos antibióticos causan por sí mismos.

Cadmio: Tal como se observa en la figura 11d, es apreciable el efecto potenciador que este metal ejerce sobre la capacidad inhibitoria de las diferentes concentraciones utilizadas de kanamicina. Puede observarse que en la combinación de 1/8 de la CMI de cada componente se logra el mismo efecto ($p<0.05$) que el causado por el antibiótico a 1/2 de su CMI, mientras que las demás combinaciones causan desde un 80% de inhibición hasta una completa inhibición del crecimiento de esta cepa resistente.

En el caso de las combinaciones de este metal con ampicilina, se puede observar, figura 12c), que todas las combinaciones presentan potenciación de los efectos inhibitorios del metal, en su mayoría causan una inhibición total del crecimiento de la cepa de *E. coli* resistente a este antibiótico, siendo aquellas las que se resultan de combinar 1/4 y 1/2 de la CMI de cadmio con las diferentes fracciones de CMI del antibiótico, así como aquella que resulta de colocar 1/8 de la CMI del metal con 1/2 de la CMI del antibiótico. Cabe mencionar que todas ellas son significativamente diferentes a sus respectivos controles ($p<0.05$)

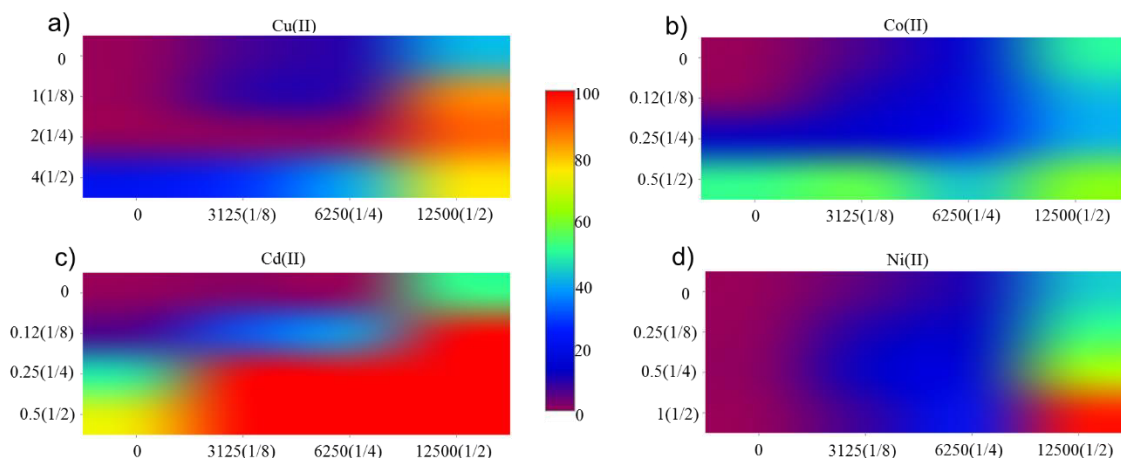


Figura 12. Efecto inhibitorio de ampicilina potenciado por metales en cepa de *E. coli* resistente a este antibiótico. Mapas de calor de los porcentajes de inhibición de las combinaciones metal-ampicilina realizadas; la barra del centro indica el porcentaje de inhibición que representa el gradiente de colores; concentraciones de ampicilina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

Níquel: Este metal, en contraparte del zinc, solo mostró potenciación de los efectos inhibitorios al combinarse con ampicilina en la etapa anterior, por lo que solo se utilizó en las pruebas con la cepa de *E. coli* resistente a éste. Para este caso se observa la tendencia que se ha ido mostrando en los diferentes resultados de este estudio, donde la potenciación del efecto inhibitorio se manifiesta en la combinación que involucra 1/2 de la CMI de cada componente logrando una inhibición de 97.66% del crecimiento de la cepa, y en menor medida, aquella resultante de combinar 1/4 de la CMI de cadmio con 1/2 de la CMI de ampicilina, la cual causa un 65.40% de inhibición sobre la cepa resistente, siendo estas combinaciones significativamente diferentes ($p < 0.05$) a sus respectivos controles.

5.8 Análisis de interacciones entre metales y antibióticos en cultivos en fase de crecimiento exponencial de cepas transformadas *E. coli*

De la misma forma que para los análisis en cepas sensibles a los antibióticos, se tomaron los datos del crecimiento de las cepas de *E. coli* resistentes y se aplicaron a la fórmula (1), obteniendo valores numéricos menores, iguales o mayores a cero, que corresponden a un efecto antagónico, aditivo o sinérgico, respectivamente, entre los componentes de cada combinación metal-antibiótico, representados por código de colores.

Para los ensayos en donde se combinaron los metales de transición para ver su capacidad de potenciar el efecto inhibitorio de kanamicina, se logra apreciar, figura 13, que la mayoría de los efectos entre estos son sinérgicos, observando que confirman los resultados expresados en la etapa anterior. Observamos que se conserva la tendencia de presentar estos efectos en las combinaciones que involucran 1/2 de las CMI de alguno de los componentes.

De manera similar, como se puede observar en la figura 14, las combinaciones metal-ampicilina muestran un efecto en su mayoría sinérgico, corroborando los datos obtenidos en la etapa anterior. Así mismo, como se puede observar en las figuras 13c y 14b, las combinaciones cobalto-antibiótico no muestran el efecto sinérgico que se busca y se aprecia en los demás metales, y aunque se logran apreciar algunas combinaciones con este efecto, no logran ser favorables para el estudio.

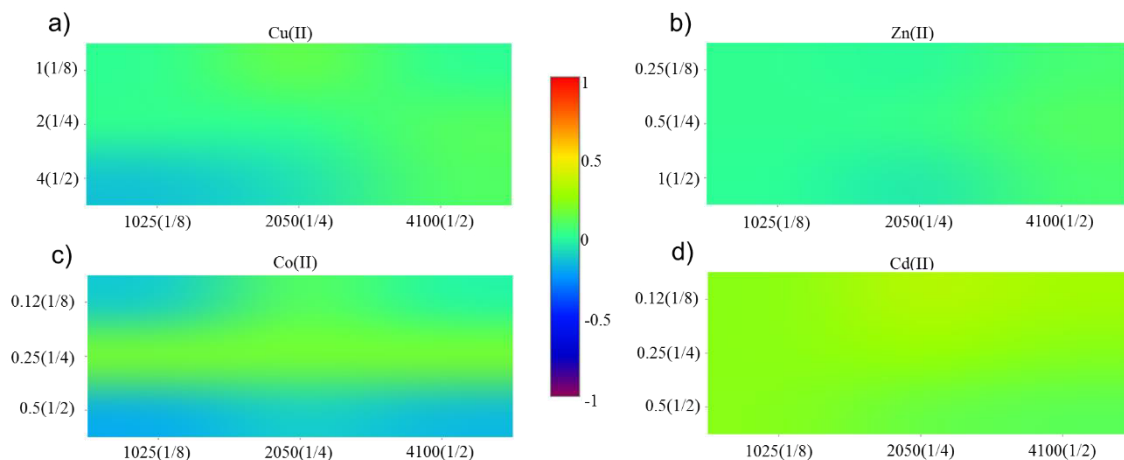


Figura 13. Tipo de interacción metal-kanamicina en cepa de *E. coli* resistente a este antibiótico. Mapas de calor del efecto antagónico (< 0), aditivo ($= 0$) o sinérgico (> 0) de las combinaciones metal-kanamicina realizadas; la barra el centro indica el grado de interacción que representa el gradiente de colores; concentraciones de kanamicina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

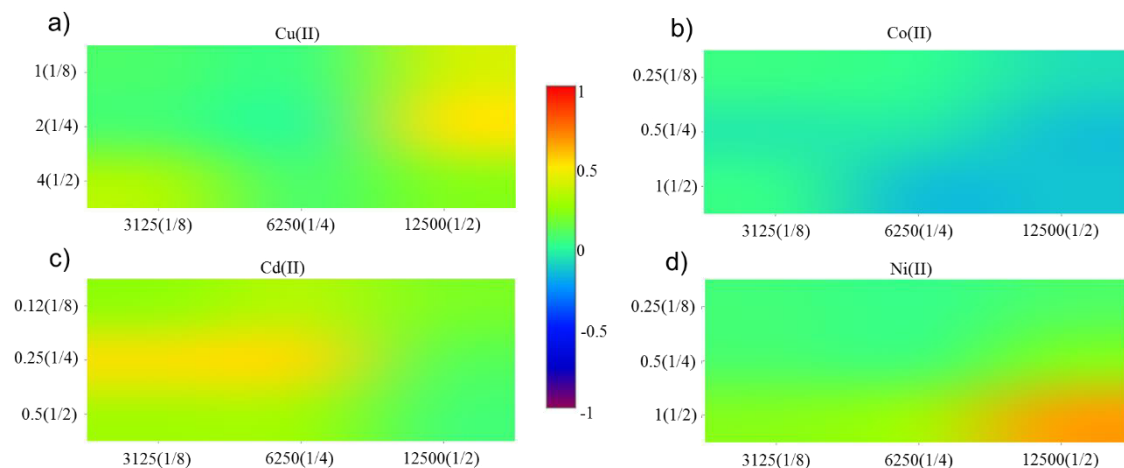


Figura 14. Tipo de interacción metal-ampicilina en cepa de *E. coli* resistente a este antibiótico. Mapas de calor del efecto antagónico (< 0), aditivo ($= 0$) o sinérgico (> 0) de las combinaciones metal-ampicilina realizadas; la barra el centro indica el grado de interacción que representa el gradiente de colores; concentraciones de ampicilina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

5.9 Curva de crecimiento de *S. aureus* en medio TSB

Como se puede observar en la figura 15, para la cepa de *S. aureus* ATCC 6538, de manera similar que para *E. coli* (véase figura 5), al encontrarse nuestro cultivo a una densidad óptica aproximada de 0.2 unidades de absorbancia a 600 nm se aprecia el inicio de esta fase de crecimiento exponencial, resultando en un cultivo de células viables en una concentración celular de $\sim 10^7$ UFC/mL.

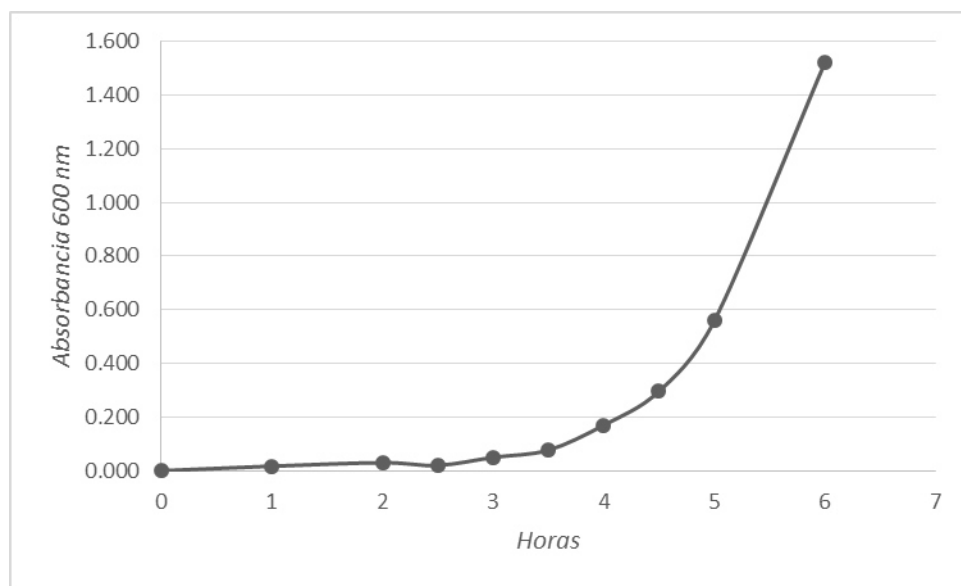


Figura 15. Crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538. OD₆₀₀ de un cultivo de *S. aureus* con respecto al tiempo en horas del inóculo 1:250 en medio LB a 37°C-150 rpm.

5.10 Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias de los metales y antibióticos

Una vez determinada esta concentración celular a una densidad óptica específica se continuó con los ensayos para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias. Estas CMIs se encuentran resumidas en la tabla 5, tanto para los metales de transición utilizados como para los antibióticos con las cuales

se busca el efecto sensibilizador favorable para este estudio. Para este microorganismo, debido a los resultados observados con *E. coli* no se incluyó al antibiótico ciprofloxacino para las pruebas.

Tabla 5. Concentraciones mínimas inhibitorias para <i>S. aureus</i> ATCC 6538		
Compuesto	CMI (mM)	CMI (ppm)
Cd ²⁺	4	-
Zn ²⁺	8	-
Ni ²⁺	4	-
Co ²⁺	2	-
Cu ²⁺	8	-
Ampicilina	-	0.25
Kanamicina	-	8
Meticilina	-	1
Concentraciones mínimas inhibitorias obtenidas para <i>Staphylococcus aureus</i> de los metales de transición y antibióticos a utilizar		

Una vez determinada la concentración mínima inhibitoria de cada uno de los compuestos a utilizar en este estudio, se procedió a realizar las pruebas combinatorias mediante ensayos checkerboard. Se probaron combinaciones de Cd(II), Zn(II), Ni(II), Co(II) y Cu(II) con ampicilina, kanamicina y metilicina, a concentraciones de 1/2, 1/4 y 1/8 de su correspondiente CMI, resultando en un total de 9 combinaciones para cada par metal-antibiótico.

5.11 Comportamiento de cultivos en fase de crecimiento exponencial de *S. aureus* ATCC 6538 en combinaciones metal-antibiótico

Se obtuvieron buenas interacciones para kanamicina, donde cuatro de los cinco metales incluidos en el estudio mostraron porcentajes altos de inhibición al combinarse con los antibióticos antes mencionados. Mientras que en las

combinaciones con los antibióticos β -lactámicos ampicilina y meticilina no mostraron el mismo comportamiento, siendo pocos los casos de potenciación con los metales de transición utilizados.

Cobre: Para las combinaciones realizadas con kanamicina, como se puede observar en la figura 16a, se obtiene un aumento de los efectos inhibitorios en cada una de éstas. Puede apreciarse que se obtienen cuatro combinaciones que son mayores ($p < 0.05$) los efectos inhibitorios causados por los diferentes controles (mostrando la tendencia que se ha estado observando en los diferentes ensayos), las cuales resultan de combinar 1/4 de la CMI del metal con 1/2 de la CMI del antibiótico, así como las combinaciones de 1/2 de la CMI del metal con las diferentes fracciones de la CMI de kanamicina, siendo todas estas mayores al 80% de inhibición, donde la mayor inhibición fue causada por la primer combinación mencionada, y la menor por la resultante de colocar 1/2 de la CMI de cobre con 1/8 de la CMI de kanamicina en el cultivo de la bacteria Gram-positiva.

Zinc: En el caso particular de las combinaciones realizadas con este metal y el antibiótico kanamicina, tal como se observa en la figura 16b) no se logra apreciar que aumenten los valores de inhibición conforme se aumentan las concentraciones del metal/antibiótico en comparación con sus controles, especialmente del metal. Sin embargo, en la combinación resultante de colocar 1/8 de la CMI de este metal con 1/2 de la CMI del antibiótico se observa un comportamiento totalmente diferente a los observados en las demás

combinaciones, resultando una inhibición, casi total, del 95.44%, siendo esta diferente significativamente a sus respectivos controles.

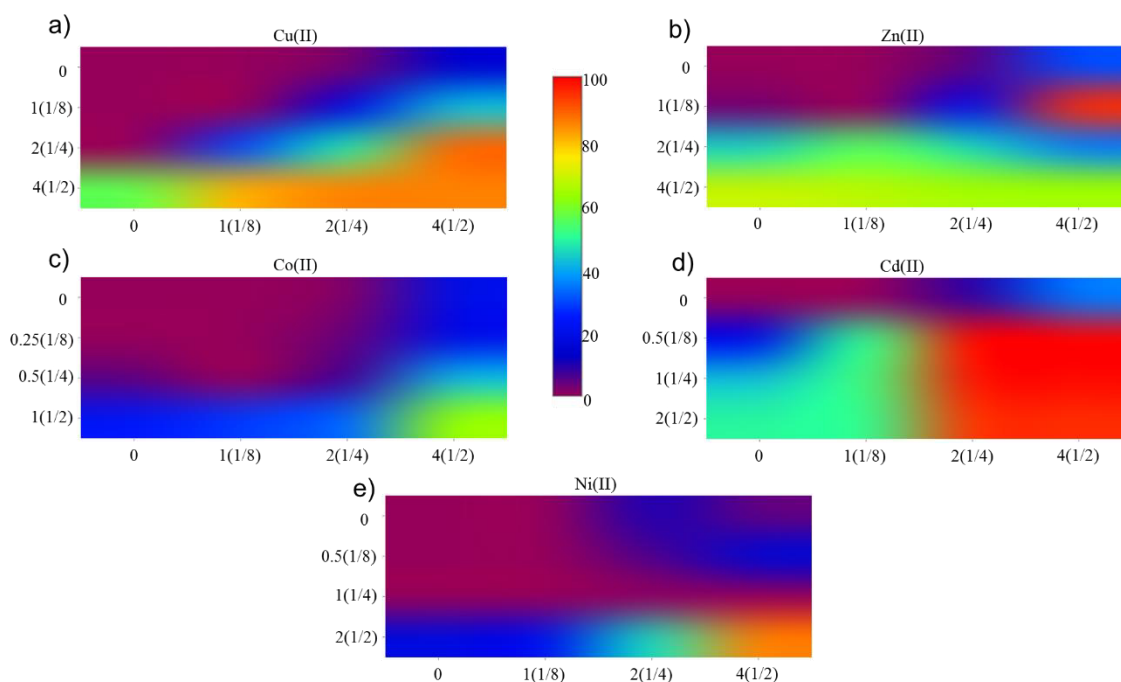


Figura 16. Efecto inhibitorio de kanamicina potenciado por metales en cepa de *S. aureus* ATCC 6538. Mapas de calor de los porcentajes de inhibición de las combinaciones metal-kanamicina realizadas; la barra del centro indica el porcentaje de inhibición que representa el gradiente de colores; concentraciones de kanamicina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

Cobalto: En las diferentes combinaciones de este metal con kanamicina, se puede observar, figura 16c), un efecto similar al obtenido con zinc, donde no se aprecia un aumento considerable de los porcentajes de inhibición de las diferentes fracciones de CMI de cada componente. Sin embargo, para aquella resultante de combinar 1/2 de la CMI del antibiótico con 1/2 de la CMI del metal, se logra apreciar un aumento significativo ($p < 0.05$) de los efectos inhibitorios que

aunque menores al 80% que se pretende utilizar como resultado favorable en este estudio puede ser de utilidad para el mismo.

Para este metal, el antibiótico β -lactámico ampicilina, se presentó una combinación que aumentó significativamente ($p<0.05$) el efecto inhibitorio de sus respectivos controles, al combinar 1/2 de las CMI de cada componente, resultando en un 75.36% de inhibición, tal como se observa en la figura 17c).

Cadmio: Como podemos observar en las figuras 15d), 16d) y 17d), este metal presentó resultados muy favorables únicamente en las combinaciones realizadas con kanamicina, donde se obtienen inhibiciones relativamente completas. En este caso se presentan estos resultados con las combinaciones correspondientes de colocar en el cultivo de *S. aureus* 1/4 y 1/2 de la CMI de kanamicina con las diferentes fracciones de la CMI del metal, siendo todas estas diferentes significativamente de sus respectivos controles ($p<0.05$).

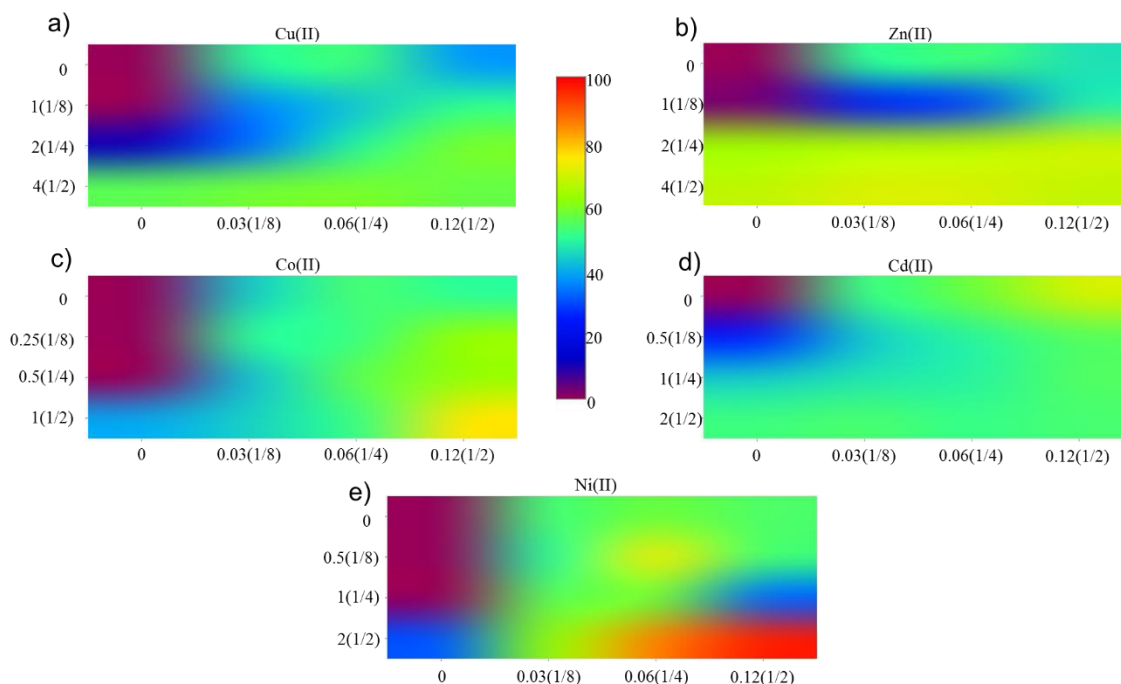


Figura 17. Efecto inhibitorio de ampicilina potenciado por metales en cepa de *S. aureus* ATCC6538. Mapas de calor de los porcentajes de inhibición de las combinaciones metal-ampicilina realizadas; la barra del centro indica el porcentaje de inhibición que representa el gradiente de colores; concentraciones de ampicilina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

Níquel: Para las combinaciones de este metal realizadas con kanamicina, como se muestra en la figura 16e, se observa que en las combinaciones que involucran 1/2 de la CMI del metal, a medida que aumenta la fracción de la CMI del antibiótico se aprecia un aumento en el efecto inhibitorio, dando como mejor resultado la combinación que involucra 1/2 de la CMI de cada componente, dando un 86.01% de inhibición y siendo diferente a sus respectivos controles ($p < 0.05$).

En el caso de los antibióticos β -lactámicos, con este metal se obtuvieron resultados muy favorables para el estudio, siendo este el único de los cinco metales utilizados que logra inhibiciones mayores al 80%. Para las combinaciones níquel-ampicilina, figura 17e, se tienen dos combinaciones donde se potencia de manera significativa ($p < 0.05$) el porcentaje de inhibición del

antibiótico, donde se coloca 1/2 de la CMI del metal con 1/4 y 1/2 de la CMI de ampicilina, resultando en un porcentaje de inhibición de 85.45% y 96.70% respectivamente. Mientras que para las combinaciones níquel-meticilina, figura 18e, obtenemos tres combinaciones que son significativamente diferentes a sus controles ($p < 0.05$), las cuales resultan de colocar 1/2 de la CMI del metal con las diferentes fracciones de la CMI de metilina, obteniendo porcentajes de inhibición de 84.80%, 96.01% y 98.26% para las combinaciones que involucran 1/8, 1/4 y 1/2 de la CMI de metilina, respectivamente.

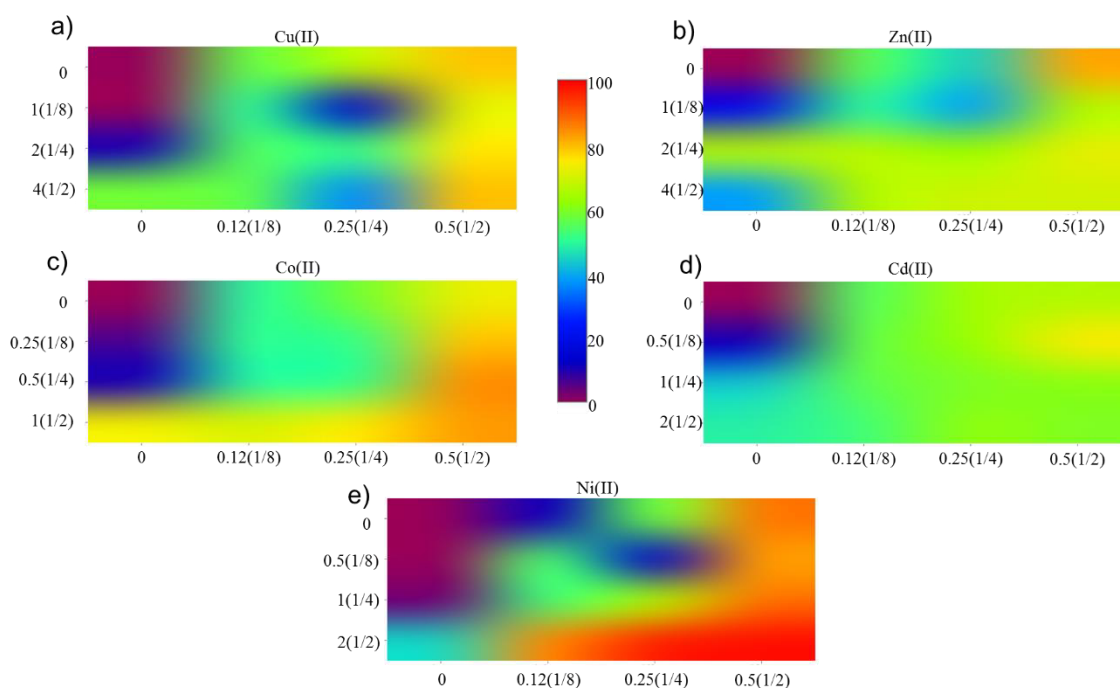


Figura 18. Efecto inhibitorio de metilina potenciado por metales en cepa de *S. aureus* ATCC 6538 Mapas de calor de los porcentajes de inhibición de las combinaciones metal-metilina realizadas; la barra del centro indica el porcentaje de inhibición que representa el gradiente de colores; concentraciones de metilina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

5.12 Análisis de interacciones entre metales y antibióticos en cultivos en fase de crecimiento exponencial de *S. aureus* ATCC 6538

De las combinaciones realizadas en la sección anterior, se tomaron los datos del crecimiento de *S. aureus* y se aplicaron a la fórmula (1), obteniendo valores numéricos menores, iguales o mayores a cero, que corresponden a un efecto antagónico, aditivo o sinérgico, respectivamente, entre los componentes de cada combinación metal-antibiótico, representados por código de colores.

Se observa en la figura 19 que cuatro de los cinco metales presentan en su mayoría efecto sinérgico al combinarse con el antibiótico aminoglucósido kanamicina, mostrando una tendencia a presentar este efecto conforme aumentan las fracciones de la CMI de cada componente, siendo las combinaciones con zinc las que presentan en su mayoría efectos antagónicos con este antibiótico.

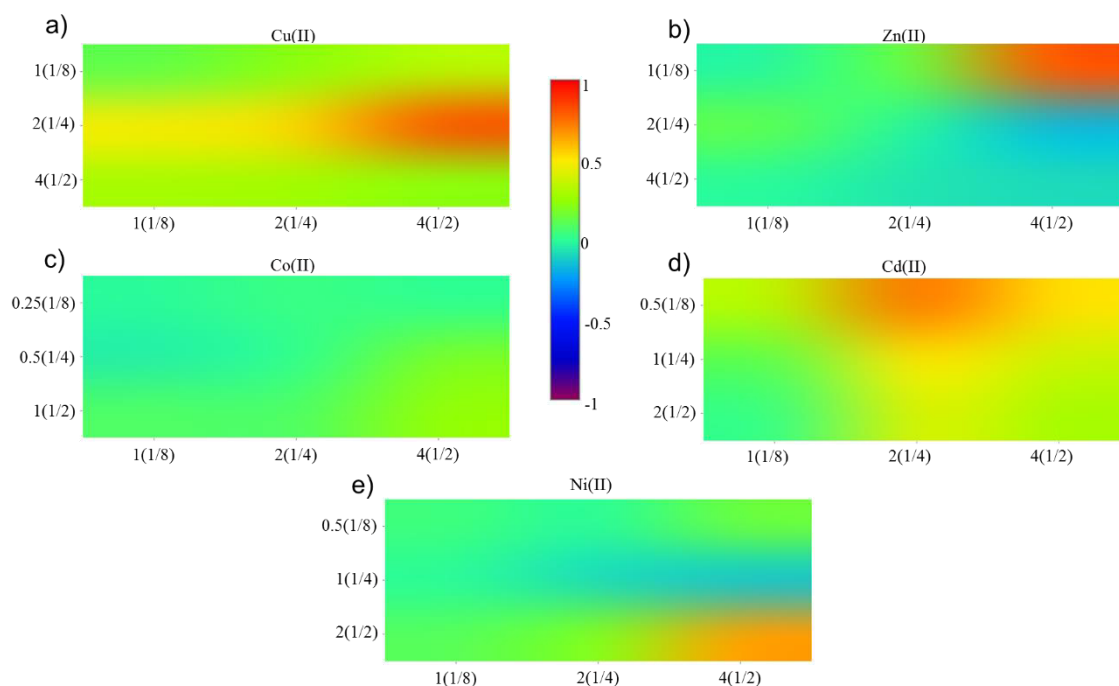


Figura 19. Tipo de interacción metal-kanamicina en cepa de *S. aureus* ATCC 6538. Mapas de calor del efecto antagónico (< 0), aditivo ($= 0$) o sinérgico (> 0) de las combinaciones metal-kanamicina realizadas; la barra el centro indica el grado de interacción que representa el gradiente de colores; concentraciones de kanamicina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

En el caso de las combinaciones metal-ampicilina realizadas, figura 20, tres de los metales (Cu(II), Zn(II), Cd(II)) presentan en su mayoría, y dos de ellos en su totalidad, efectos antagónicos con respecto a la inhibición del cultivo de *S. aureus*, mientras que Co(II) y Ni(II) presentan mayoritariamente interacciones sinérgicas para este efecto inhibitorio, aunque solo níquel haya presentado resultados de inhibición significativamente diferentes a sus controles.

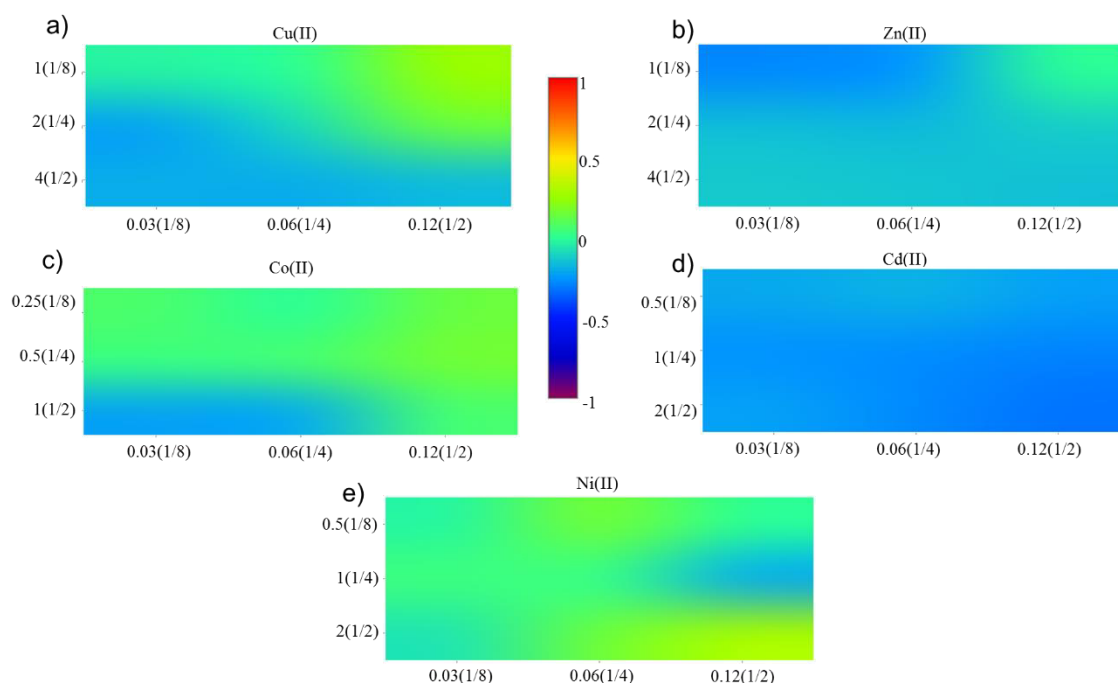


Figura 20. Tipo de interacción metal-ampicilina en cepa de *S. aureus* ATCC 6538. Mapas de calor del efecto antagónico (< 0), aditivo ($= 0$) o sinérgico (> 0) de las combinaciones metal-ampicilina realizadas; la barra el centro indica el grado de interacción que representa el gradiente de colores; concentraciones de ampicilina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

Mientras tanto, para las combinaciones metal-meticilina, figura 21, solo las realizadas con níquel presentan efectos sinérgicos, notando que la tendencia a este efecto se encuentra orientado a las combinaciones donde se aumenta la fracción de la CMI del metal, pero disminuye la fracción del antibiótico, a

diferencia de las tendencias que se han presentado para las demás combinaciones metal-antibiótico.

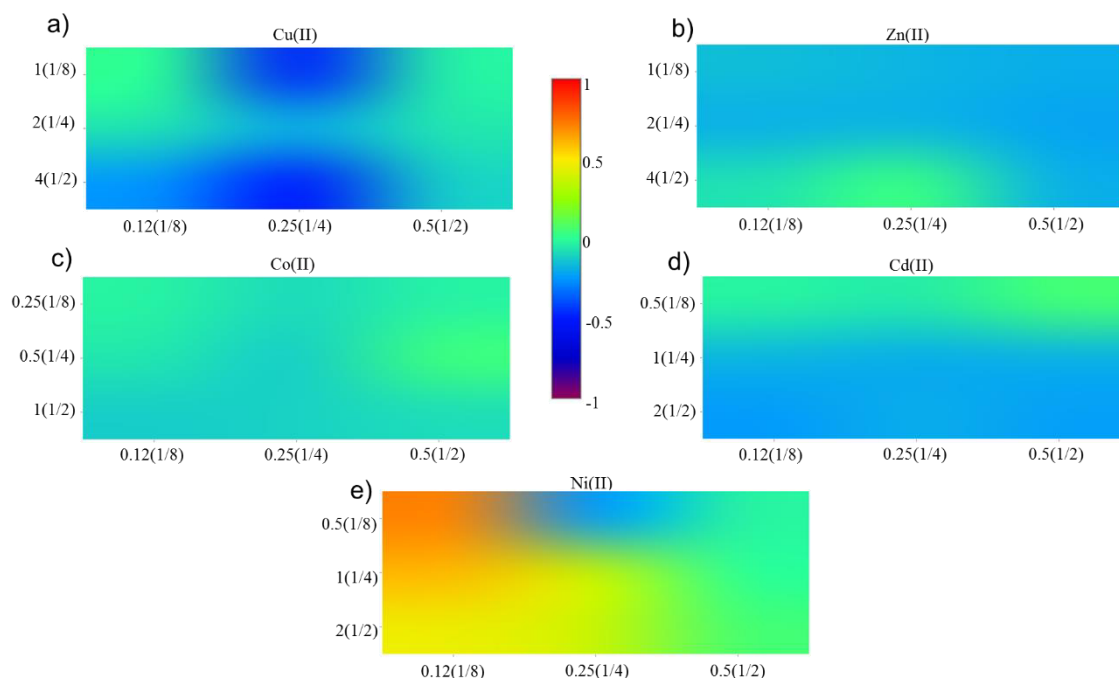


Figura 21. Tipo de interacción metal-meticilina en cepa de *S. aureus* ATCC 6538. Mapas de calor del efecto antagónico (< 0), aditivo ($= 0$) o sinérgico (> 0) de las combinaciones metal-meticilina realizadas; la barra el centro indica el grado de interacción que representa el gradiente de colores; concentraciones de metilicina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

5.13 Comportamiento de cultivos en fase estacionaria de *S. aureus*

ATCC 6538 en combinaciones metal-antibiótico

Una vez observado que, en el caso de *S. aureus* como modelo de bacteria Gram-positiva, únicamente níquel es capaz de potenciar el efecto inhibitor de los antibióticos β -lactámicos utilizados, se realizaron combinaciones de 1/2, 1 y 2 veces la CMI de cada componente, níquel-ampicilina, y níquel-meticilina, en un cultivo de la bacteria en estado estacionario de crecimiento, con el objetivo de

observar, al igual que se realizó para los cultivos de *E. coli*, si presentan efecto bactericida en esta fase de crecimiento.

En la tabla 6 se resumen los resultados obtenidos de estas pruebas, donde se puede apreciar que algunas de las combinaciones realizadas presentan un efecto bactericida sobre la bacteria en estado estacionario de crecimiento. Se puede resaltar la combinación de 2 CMI del metal con 1/2 de la CMI de ampicilina, la cual logra reducir 0.85 log, mientras que con meticilina logra reducir 0.35 log de bacterias viables.

a)

Log UFC/mL				
Ni/Amp	0	0.12	0.25	0.5
0	8.35	8.08	8.25	8.30
2	8.05	8.13	8.15	8.05
4	8.48	8.59	8.13	8.15
8	7.76	7.30	7.95	7.60

Δ Log UFC/mL				
Ni/Amp	0	0.12	0.25	0.5
0	0.20	-0.07	0.10	0.15
2	-0.10	-0.02	0.00	-0.10
4	0.33	0.44	-0.02	0.00
8	-0.39	-0.85	-0.20	-0.55

b)

Log UFC/mL				
Ni/Met	0	0.5	1	2
0	8.97	8.59	8.49	8.61
2	8.90	8.60	8.80	8.97
4	8.72	8.78	8.59	8.48
8	8.30	8.65	8.42	8.04

Δ Log UFC/mL				
Ni/Met	0	0.5	1	2
0	0.58	0.20	0.10	0.22
2	0.51	0.21	0.41	0.58
4	0.33	0.39	0.20	0.09
8	-0.09	0.26	0.03	-0.35

Tabla 6. Efecto bactericida metal-antibiótico en cepa de *S. aureus* ATCC 6538 en fase estacionaria de crecimiento. Efecto bactericida de las combinaciones níquel-ampicilina y níquel-meticilina en fase estacionaria; tablas de la columna izquierda indican la supervivencia en LogCFU/mL de *S. aureus* en cada prueba; tablas de la columna derecha indican la diferencia de la supervivencia en LogCFU/mL en comparación con el control al iniciar la prueba; concentraciones de ampicilina (abscisa) expresadas en ppm; concentraciones de metales (ordenada) expresadas en mM.

5.14 Obtención de *S. aureus* resistente a ampicilina, kanamicina y meticilina

Ya que se observaron los efectos que estos metales tienen sobre el crecimiento de la bacteria al estar en conjunto con un antibiótico se procedió a la

obtención de las cepas resistentes a éstos, transformándola con los plásmidos que le confieran tal característica (plásmidos incluidos en el anexo 1). En la tabla 7 se evidencia la obtención de las cepas de *S. aureus* transformadas con el incremento de las CMI de cada antibiótico con respecto a la cepa susceptible que se muestran en la tabla 5, mientras que la figura y muestra la presencia de plásmido en las cepas.

Tabla 7. Características de las cepas de <i>S. aureus</i> transformadas			
Bacteria	Plásmido	Resistencia	CMI (ppm)
<i>S. aureus-Kan</i>	pUC57-Kan	Kanamicina	256
<i>S. aureus-Amp</i>	pUC57-Amp	Ampicilina	1
<i>S. aureus-Met</i>	pUC57-Met	Meticilina	2
La concentración mínima inhibitoria especificada para cada cepa corresponde únicamente al antibiótico para el cual es resistente.			

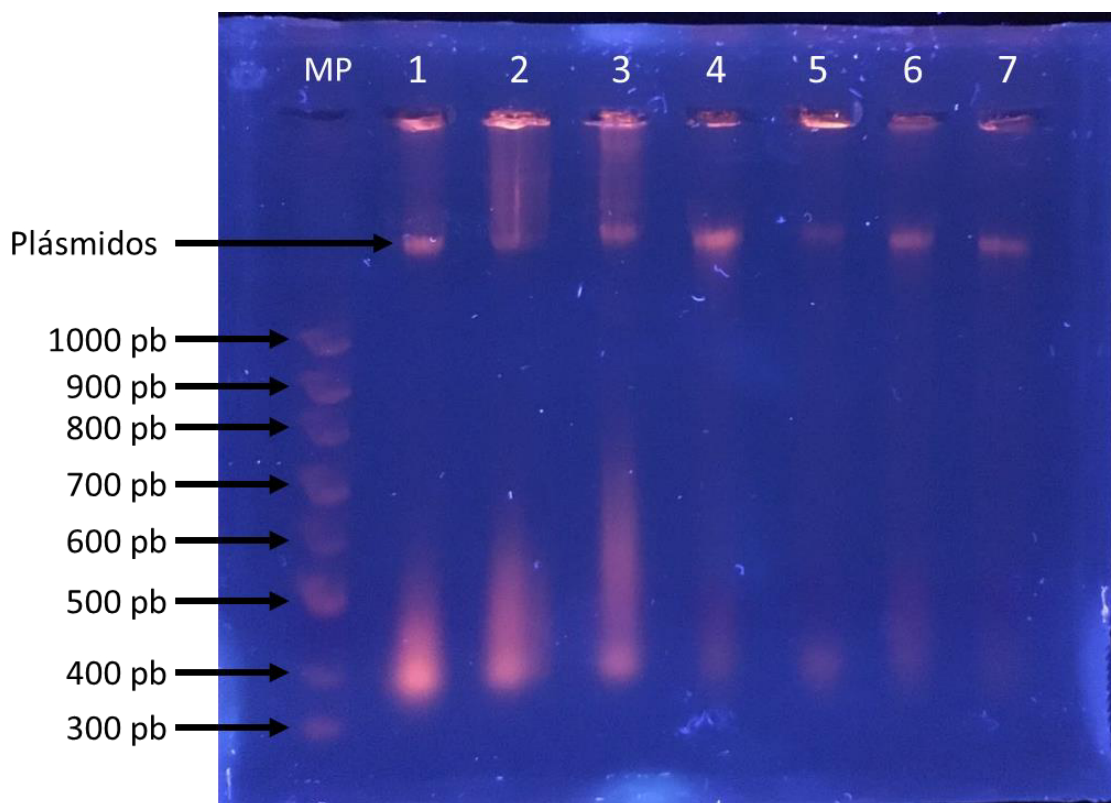


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa para las cepas de *S. aureus*. Gel de electroforesis de la extracción de DNA plasmídico de las cepas de *S. aureus* utilizadas; MP: marcador de peso molecular; 4: *S. aureus* ATCC 6538; 5: *S. aureus*-Kan; 6: *S. aureus*-Amp; 7: *S. aureus*-Met.

5.15 Comportamiento de cultivos en fase de crecimiento exponencial de cepas transformadas de *S. aureus* en combinaciones metal-antibiótico

Una vez obtenidas las cepas resistentes a los antibióticos de prueba se precedió a ver si los metales de estudio son capaces de re-sensibilizar la bacteria a estos antibióticos.

Cobre: Para las combinaciones realizadas en los cultivos de la cepa resistente a kanamicina, figura 23a, se logra observar que se obtienen buenos resultados inhibitorios al combinar 1/4 de la CMI del metal con 1/2 de la CMI del

antibiótico, así como en las distintas combinaciones de 1/2 de la CMI de cobre con las fracciones de la CMI del antibiótico, obteniendo un 89.10% de inhibición para la primer combinación mencionada y de un 81-83% de inhibición para las que involucran 1/2 de la CMI de cobre; siendo estas diferentes significativamente de sus respectivos controles ($p<0.05$).

Zinc: En las combinaciones zinc-kanamicina realizadas para la cepa resistente a este antibiótico, tal como se observa en la figura 23b todas las combinaciones realizadas exhiben un porcentaje de inhibición mayor al 90%, siendo significativamente diferentes a sus respectivos controles ($p<0.05$), logrando en algunas de ellas una inhibición prácticamente total del cultivo resistente a kanamicina.

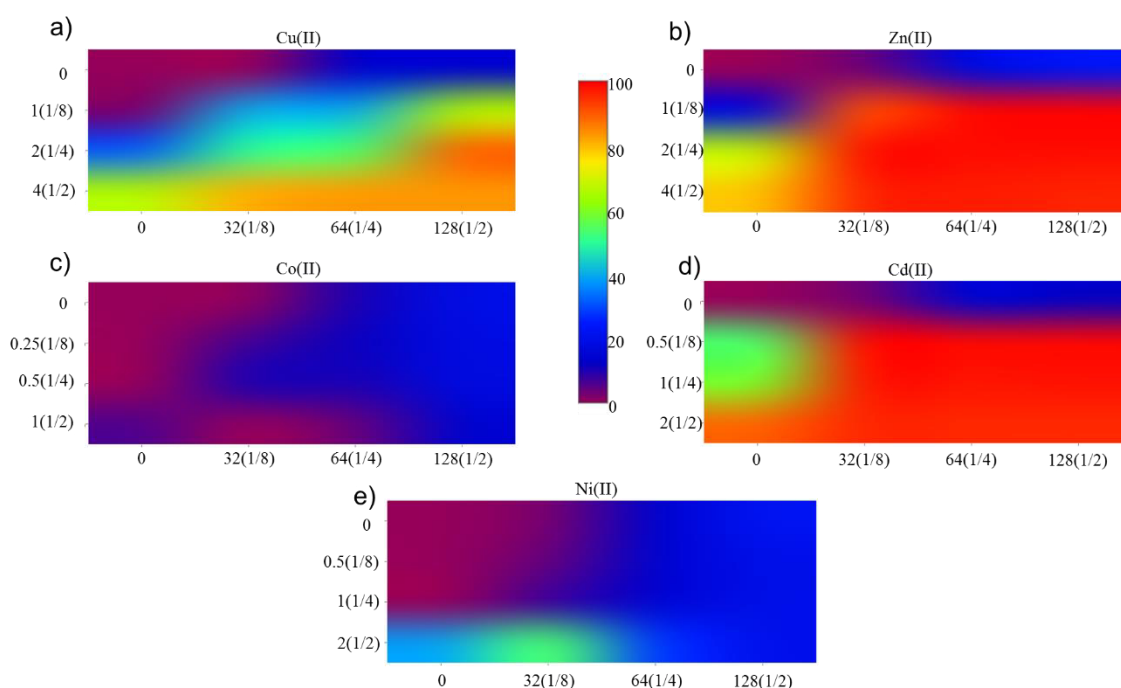


Figura 23. Efecto inhibitorio de kanamicina potenciado por metales en cepa de *S. aureus* resistente a este antibiótico. Mapas de calor de los porcentajes de inhibición de las combinaciones metal-kanamicina realizadas; la barra del centro indica el porcentaje de inhibición que representa el gradiente de colores; concentraciones de kanamicina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

Cobalto: Para las combinaciones realizadas en los cultivos resistentes a kanamicina, se puede observar en la figura 23c, que no se logra potenciar de manera importante el efecto inhibitorio del antibiótico a esta cepa resistente, siendo en algunos casos menor su inhibición que en sus controles respectivos.

Cadmio: De manera similar a lo ocurrido en las combinaciones zinc-kanamicina para la cepa resistente a kanamicina, todas las combinaciones realizadas con este último y cadmio, figura 23d nos dan un porcentaje de inhibición mayor al 90%, lo cual evidencia el efecto re-sensibilizador de estos dos metales frente al antibiótico para una cepa de *S. aureus* resistente a kanamicina.

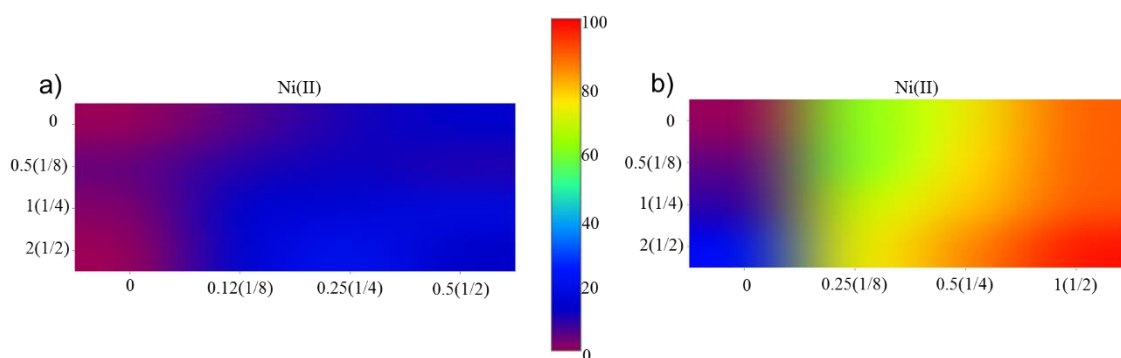


Figura 24. Efecto inhibitorio de antibióticos β -lactámicos potenciados por metales en cepa de *S. aureus* resistente a estos. Mapas de calor de los porcentajes de inhibición de las combinaciones a) metal-ampicilina y b) metal-meticilina realizadas; la barra del centro indica el porcentaje de inhibición que representa el gradiente de colores; concentraciones de los antibióticos (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

Níquel: En el caso de las combinaciones realizadas con este metal para la cepa resistente a kanamicina, solo se observa una combinación que potencia el efecto inhibitorio del antibiótico, figura 23e, en menor proporción que los resultados obtenidos con los demás metales.

Para las pruebas realizadas con los antibióticos β -lactámicos, ampicilina y meticilina, realizadas únicamente con este metal, se logra apreciar que no existe una potenciación significativa. En la figura 24a observamos que, a diferencia de lo que se podría esperar debido a las interacciones obtenidas en la cepa sensible, no existe alguna combinación en la que se obtenga el porcentaje de inhibición buscado para estos estudios. Mientras que en las combinaciones realizadas con meticilina, figura 24b, se observa que aunque algunas de ellas causan un 80% de inhibición, incluso uno mayor, no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) que la inhibición que causan sus respectivos controles, específicamente los del antibiótico.

5.16 Análisis de interacciones entre metales y antibióticos en cultivos en fase de crecimiento exponencial de cepas transformadas *S. aureus*

De las combinaciones realizadas en la sección anterior, se tomaron los datos del crecimiento de *S. aureus* resistentes a los diferentes antibióticos utilizados y aplicando la fórmula (1), se obtuvieron valores numéricos menores, iguales o mayores a cero, que corresponden a un efecto antagónico, aditivo o sinérgico, respectivamente, entre los componentes de cada combinación metal-antibiótico, representados en gráficos del tipo “mapas de calor”.

Como se puede observar en la figura 25, todos los metales de estudio presentan en su mayoría efectos sinérgicos al combinarse con kanamicina en los cultivos resistentes a este último. Tres de estos, Cu(II), Zn(II) y Cd(II), presentan en su totalidad efecto sinérgico, mientras que Co(II) y Ni(II) poseen

combinaciones donde se observa un efecto antagónico, y éste último presenta una con efecto aditivo.

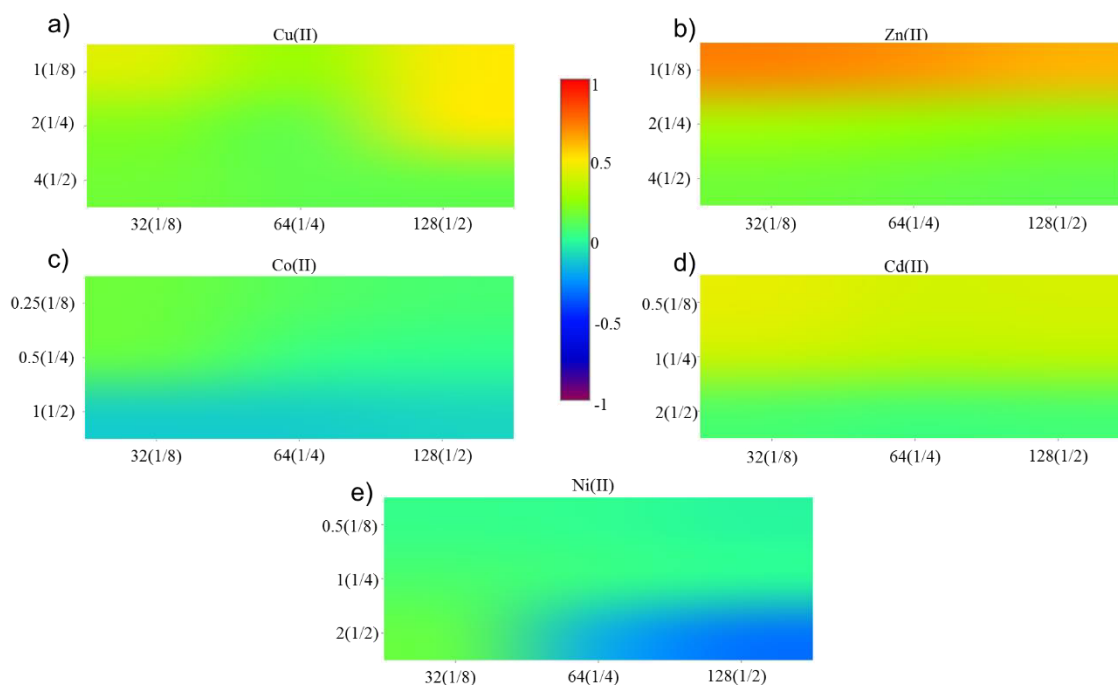


Figura 25. Tipo de interacción metal-kanamicina en cepa de *S. aureus* resistente a este antibiótico. Mapas de calor del efecto antagónico (< 0), aditivo ($= 0$) o sinérgico (> 0) de las combinaciones metal-kanamicina realizadas; la barra el centro indica el grado de interacción que representa el gradiente de colores; concentraciones de kanamicina (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

La figura 26 representa las interacciones encontradas mediante la aplicación de la fórmula (1) de los datos obtenidos en las pruebas de inhibición donde se combinó Ni(II) junto con los antibióticos β -lactámicos incluidos en el presente estudio. Como se puede apreciar, aunque la mayoría de estas sean de naturaleza sinérgica, tienden a orientarse hacia los valores de aditividad, tanto para las combinaciones con ampicilina (figura 26a) como para las realizadas con metilicina (figura 26b).

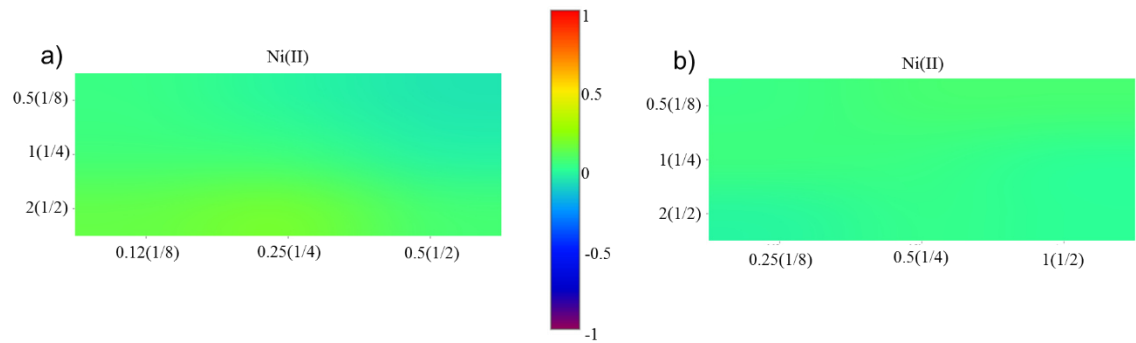


Figura 26. Tipo de interacción metal-antibiótico β -lactámico en cepa de *S. aureus* resistente a estos. Mapas de calor del efecto antagónico (< 0), aditivo ($= 0$) o sinérgico (> 0) de las combinaciones a) metal-ampicilina y b) metal-meticilina en cepas resistentes a estos antibióticos; la barra el centro indica el grado de interacción que representa el gradiente de colores; concentraciones de antibióticos (eje x) expresadas en ppm(fracción de CMI); concentraciones de metales (eje y) expresadas en mM(fracción de CMI).

CAPÍTULO 6

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como ya se había mencionado con anterioridad, existe una diversidad de compuestos que le son de utilidad a los diferentes microorganismos que les permiten llevar a cabo la variedad de funciones esenciales para su correcto funcionamiento. Entre ellos se encuentran los metales y demás elementos traza que funcionan como co-factores de enzimas y proteínas, pero también estos metales llegan a ser dañinos para la célula al encontrarse en concentraciones mayores a las requeridas o toleradas por el microorganismo.

En el presente trabajo se aprovechó el hecho de que los metales que son esenciales para los microorganismos son capaces a su vez de ser dañinos para los mismos, con el fin de que al utilizarlos de manera conjunta con algún antibiótico, esta combinación sea capaz de producir un efecto inhibitorio semejante al que causaría el antibiótico por sí mismo, logrando a su vez disminuir la cantidad tanto de metal como de antibiótico necesaria para lograr tal efecto. Esto último llevaría a utilizar los metales que dieron tal característica contra bacterias resistentes a algún antibiótico, lo que podría resultar en una re-

sensibilización de estas a dicho antibiótico y con esto requerir menos cantidad de este último para lograr su inhibición.

Para lograr los objetivos propuestos en el presente trabajo, se realizaron pruebas para encontrar las concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas bacterianas utilizadas, observando que estas se encuentran dentro de un rango pequeño entre ellas, no superando concentraciones de 10 mM. Para *E. coli* la mayoría se encuentran entre 1 y 2 mM y para *S. aureus* se logra observar la mayoría entre 2 y 4 mM. Estas concentraciones son similares a las que se han observado por diversos autores. Beard *et al.*[49] observaron inhibición completa para cultivos de *E. coli* en presencia de ZnSO_4 a una concentración 2 mM. De manera similar, Brocklehurst *et al.*[50] reportan la inhibición de *E. coli* en medio LB con Zn(II) , Cd(II) , Co(II) y Ni(II) a concentraciones de 2.2, 1.2, 1.7 y 4 mM, respectivamente, así como Spada *et al.*[51] reportan CMI's de Zn(II) , Co(II) y Cd(II) a 2, 2.1 y 0.9 mM. Para cultivos en presencia de Cu(II) , Kershaw *et al.*[52] observaron que a una concentración 4 mM de un complejo Cu(II) -glicina no se presentó crecimiento de *E. coli*. mientras que Grass *et al.*[53] reporta una CMI de Cu(II) de 3.5 mM.

Variaciones entre las concentraciones obtenidas en el presente con las reportadas en la literatura se pueden manifestar que esto es debido al medio de cultivo que se utilice en los experimentos[54]. Se ha reportado que en medios complejos, como los son los medios utilizados en el presente al componerse de fuentes complejas de carbono y nitrógeno, la concentración mínima inhibitoria puede aumentar[50].

Posteriormente se realizaron pruebas de interacción metal-antibiótico mediante la metodología checkerboard, realizando combinaciones de estos a distintas concentraciones. Esta metodología ha sido ampliamente utilizada[47, 55-57] para observar y medir la capacidad que tienen dos agentes antimicrobianos, generalmente antibióticos, de potenciar sus efectos inhibitorios/bactericidas al utilizarse en conjunto. Además se utilizó un método numérico de análisis para determinar el grado de sinergia entre los componentes utilizados (véase 4.10 Análisis de datos), que evalúa el grado de sinergia en función al crecimiento del microorganismo en las diferentes combinaciones, comparando el obtenido en estos ensayos con el esperado al observar su comportamiento en presencia de cada compuesto por separado.

De esta forma observamos que, para los estudios realizados con *E. coli*, tanto kanamicina como ampicilina poseen interacciones de naturaleza sinérgica con los cinco metales empleados, mientras que ciprofloxacino mostró interacciones antagónicas con estos metales, como era de esperarse, debido a la formación de una variedad de complejos que pueden disminuir su acción antimicrobiana[58], aunque se ha demostrado que algunos de ellos pueden mantener o incrementar su efectividad[59]. Se puede observar que existe una tendencia de interacciones sinérgicas en ciertas zonas de las combinaciones realizadas, mayoritariamente hacia las combinaciones donde aumentan las concentraciones de uno de los dos componentes, también cabe resaltar que aquellas combinaciones donde se presentó una inhibición significativa se presenta sinergia entre los componentes. Esto fue observado también por Lin *et*

al. [60] en ensayos con *L. pneumophila*, donde las interacciones sinérgicas se presentaron en las combinaciones de las concentraciones altas, mientras que al disminuir las concentraciones resultaban antagónicas.

En el caso de los experimentos realizados con *S. aureus* se observó que no todos los metales presentan interacciones de naturaleza sinérgica al encontrarse en combinación con los antibióticos β -lactámicos ampicilina y meticilina. La ampicilina presentó sinergia, según la fórmula 1, con Ni(II), Co(II) y en menor medida con Cu(II), mientras que la meticilina presentó sinergia únicamente con Ni(II). De manera similar a lo ocurrido con *E. coli*, todos los ensayos de combinaciones de metal-kanamicina realizadas con *S. aureus* presentaron al menos una interacción de naturaleza sinérgica. Huang *et al.*[61] observaron que en pruebas combinatorias, en su caso Ag-Cu, los componentes pueden actuar de manera sinérgica en algunas bacterias, pero no en otras, tal como pudimos observar en nuestros resultados, donde con *E. coli* las combinaciones realizadas con ampicilina se presentan sinergia al realizarse con Cu(II), Co(II), Cd(II) y Ni(II), mientras que en las realizadas con *S. aureus* donde solo se presentó dicha interacción con Ni(II).

Se logró observar que en los ensayos combinatorios de inhibición desarrollados con *E. coli* se obtienen diversas combinaciones metal-antibiótico que causan un efecto similar al proporcionado por la CMI del antibiótico mismo, resultado que para kanamicina cuatro de los cinco metales, siendo estos Cu(II), Zn(II), Co(II) y Cd(II), lograron un efecto inhibitorio mayor al 80% al combinarse en concentraciones sub-letales. De manera similar, para los ensayos empleando

ampicilina cuatro de los cinco metales, siendo estos Cu(II), Co(II), Cd(II) y Ni(II), lograron la misma característica sobre el porcentaje de inhibición del cultivo.

En los ensayos desarrollados con *S. aureus* también se obtuvieron diversas combinaciones capaces de causar un efecto inhibitorio semejante a los antibióticos a sus respectivas CMI. Al combinarse con kanamicina, de manera similar que lo ocurrido con *E. coli*, cuatro de los cinco metales, siendo estos Cu(II), Zn(II), Cd(II) y Ni(II), causaron un porcentaje de inhibición mayor al 80%. Sin embargo, esta similitud con los resultados obtenidos en los ensayos combinatorios desarrollados con *E. coli* no fue obtenida en las combinaciones con los antibióticos β -lactámicos ampicilina y meticilina, donde únicamente Ni(II) fue capaz de potenciar el efecto inhibitorio de manera que las combinaciones fueran diferentes significativamente de los efectos causados individualmente por los componentes.

Con esto podemos apreciar que, a pesar de que en la mayoría de los ensayos combinatorios realizados se presentó al menos una interacción sinérgica metal-antibiótico, no todos los metales presentaron la capacidad de incrementar el porcentaje de inhibición de manera significativa al estar en combinación con los diferentes antibióticos. Así aquellos metales que en sus respectivas combinaciones no presentaron un porcentaje de inhibición mayor o igual al 80% fueron descartados para las siguientes pruebas.

Existe variedad de estudios donde se ha reportado el uso de metales de transición, entre los cuales se incluyen los utilizados en el presente, para sintetizar derivados de diversos antibióticos conocidos [41, 62-64], donde

además de determinar su estructura, se realizaron ensayos para comparar su actividad antimicrobiana en relación con el antibiótico original. Anacona [62] sintetizó una serie de complejos de antibióticos β -lactámicos con diversos metales de transición, entre ellos los incluidos en este estudio, observando que algunos de ellos mantenían/aumentaban la actividad antimicrobiana del antibiótico original. Comportamiento similar se observa en los estudios realizados por Bagihalli *et al.*[40] donde se sintetizan compuestos de tiazoles con Co(II), Ni(II) y Cu(II), obteniendo niveles de actividad antimicrobiana similares a la observada con los compuestos originales. Sin embargo, no se menciona un análisis para diferenciar si el efecto de estas combinaciones es de naturaleza aditiva o sinérgica, ya que ambas causarían un aumento en la actividad antimicrobiana de los compuestos en cuestión.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, la resistencia a los antibióticos ha sido un problema, desde los comienzos de las terapias que incluyeron el uso de estos fármacos, que con el paso de los años se ha ido incrementando, encaminando a los científicos a realizar investigaciones con el objetivo de vencer esta problemática. Una de las estrategias adoptadas es la de utilizar compuestos adyuvantes con el propósito de retrasar la resistencia a antibióticos al ser la célula microbiana atacada desde diferentes frentes, además de obtener combinaciones que presenten un efecto sinérgico entre sus componentes[65].

Esta estrategia fue abordada en el presente estudio, posterior a observar la capacidad de los metales antes mencionados para potenciar el efecto

inhibitorio de los diversos antibióticos que utilizamos, se procedió a realizar las combinaciones metal-antibiótico con el fin de observar si poseen la capacidad tanto de potenciar el efecto inhibitorio de los diversos antibióticos utilizados como de re-sensibilizar a la bacteria resistente a los mismos, utilizando la metodología checkerboard empleada con las cepas susceptibles. Para ello se transformaron las cepas *E. coli* y *S. aureus* con plásmidos que contienen genes que codifican para la resistencia deseada. Posterior a esto se realizó una electroforesis en gel de agarosa para corroborar que la transformación se llevaron a cabo, y aunque, como se puede observar en las figuras x y y, para las cepas susceptibles se observan bandas que corresponden a la presencia de algún plásmido, las transformaciones realizadas fueron exitosas, esto se puede evidenciar con el aumento de la CMI correspondiente al marcador del plásmido introducido. Es probable que los plásmidos contenidos en las cepas susceptibles sean plásmidos que ayuden las células a transferir material genético (plásmidos de conjugación), ya que se ha reportado que existen gran variedad de bacterias que poseen de manera natural este tipo de plásmidos[17, 66, 67].

Al igual que en lo observado con la cepa de *E. coli* ATCC 11229, al realizar las combinaciones metal-kanamicina y metal-ampicilina en la cepas resistente a estos antibióticos, es posible apreciar que se conserva la capacidad de los metales de potenciar el efecto inhibitorio del antibiótico utilizado. Para la cepa resistente a kanamicina, la capacidad de potenciar la inhibición del mismo a un efecto similar al de su CMI se conserva en tres de los cuatro metales que

presentaron este resultado en la cepa susceptible, siendo estos Cu(II), Zn(II) y Cd(II), obteniendo porcentajes de inhibición mayores al 80%. De manera similar, en los ensayos desarrollados con la cepa resistente a ampicilina, tres de los cuatro metales que lograron este efecto en la cepa susceptible, siendo estos Cu(II), Cd(II) y Ni(II), son capaces de potenciar el efecto inhibitorio del antibiótico superando el 80% de inhibición, siendo en ambos casos Co(II) el metal incapaz de presentar tal efecto de potenciación para estas cepas.

En los ensayos desarrollados con *S. aureus* resistente a kanamicina, logramos apreciar que se conservaron las tendencias sinérgicas metal-kanamicina en los metales que las presentaron con la cepa susceptible, aunque a diferencia de los ensayos con esta última, solo tres de los cinco metales, Cu(II), Zn(II) y Cd(II), lograron potenciar el efecto inhibitorio superando el 80% de inhibición.

Mientras que, al realizar los ensayos combinatorios de Ni(II) con los antibióticos β -lactámicos ampicilina y meticilina en las cepas de *S. aureus* transformadas con plásmidos que aporten la resistencia a los mismos, este metal no presentó la capacidad de re-sensibilización que se podría esperar al observar los resultados que se obtuvieron con la cepa susceptible a estos antibióticos, aun cuando la mayoría de las combinaciones presentó interacción de naturaleza mayoritariamente aditiva.

Inhibir la capacidad de los microorganismos para expresar sus mecanismos de resistencia a uno o varios antibióticos podría traer de vuelta el uso de antibióticos que actualmente son menos eficaces debido a la problemática

de la resistencia al utilizarse con agentes sensibilizadores[31, 68]. Esto puede ser causado, como lo muestran los experimentos realizados en este trabajo, por los metales de transición utilizados debido a la acción de uno o más de los mecanismos que poseen para inhibir el crecimiento microbiano[20] y aunque se ha reportado el uso de metales de transición con antibióticos para causar una sensibilización de diversos microorganismos a estos últimos, no se encontró literatura donde se utilicen con el objetivo de re-sensibilizar bacterias resistentes. Sin embargo diversos autores han observado, desde hace décadas, que el uso de coadyuvantes puede disminuir las CMI de bacterias resistentes a diversos antibióticos. Vaara *et al.*[69, 70] observaron que al utilizar policationes se logra sensibilizar una cepa de *Salmonella typhimorium* a novobiocina, eritromicina y otros compuestos antimicrobianos. De manera similar Brehm-stecher *et al.*[71] observaron que el uso de compuestos orgánicos, sesquiterpenos, sensibilizaba cepas de *S. aureus* y *E. coli* a diversos antibióticos. Estos autores determinaron que la sensibilización a estos antibióticos se debe a la capacidad que poseen de alterar la función/estabilidad de la membrana externa y/o citoplasmática, capacidad que ha sido reportada como efecto de algunos metales de transición[20].

Al realizar un análisis de las posibles aplicaciones para las estrategias que se plantean en el presente trabajo, se realizó una búsqueda bibliográfica de reportes en donde se hayan utilizado los metales aquí propuestos en diferentes organismos para su perfil toxicológico. Consultando la base de datos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), a

través de los reportes emitidos por la ATSDR se analizaron las concentraciones que aquí utilizamos. Observamos que las CMI de los metales utilizados se encuentran, muy próximas o pasando las LD₅₀ para organismos superiores (ratas/ratones) reportadas, como es el caso de la CMI de 8 mM de Cu(II) (508 ppm), donde la LD₅₀ oral que se tiene reportada ronda entre 369-794 mg/Kg en estos organismos[72], comportamiento similar se observó con la CMI de Zn(II), que para *E. coli* es de 2 mM (130 ppm) mientras que para *S. aureus* es de 8 mM (523 ppm), así, las LD₅₀ reportadas varían entre 337 y 623 mg/Kg[73].

Estas concentraciones se vieron reducidas en los experimentos combinatorios al utilizarse junto con los distintos antibióticos empleados en el presente trabajo, logrando un mejor pronóstico para la utilización de los metales. Esto se puede observar claramente en los resultados obtenidos, como en las combinaciones realizadas con Co(II), donde la CMI para *E. coli* es 1 mM (59 ppm) mientras que al combinarlo con ampicilina en la cepa susceptible la concentración de este metal se reduce a 0.12 mM (7 ppm), la cual se encuentra por debajo de la LD₅₀ reportada, siendo esta de 42.4 mg/Kg[74]. Aún con estas reducciones las concentraciones utilizadas resultan altas para ser utilizadas en seres humanos. Existen reportes de intoxicación, en diferentes grados, por metales pesados, donde se han reportado efectos leves como lo son náuseas o calambres abdominales a concentraciones menores cercanas a 1 mg/Kg para diferentes metales, 0.17 mg/Kg para Cu(II)[72], 6.7 mg/Kg para Zn(II)[73], 0.18 mg/Kg para Co(II)[74], 0.07 mg/Kg para Cd(II)[75], 7.1 mg/Kg para Ni(II)[76].

A pesar de que las concentraciones que causan efectos adversos en administración oral se encuentran por debajo de las utilizadas en este estudio, existe la posibilidad de que estas combinaciones se puedan emplear en materiales tópicos. Existen reportes de estudios de sensibilización a diferentes materiales (parches, cremas, etc.) de aplicación tópica para diferentes tratamientos, donde se emplean los metales que se mencionan en este estudio a concentraciones desde 0.01% (100 ppm) en el caso de Ni(II), hasta 5% (50000 ppm) en el caso de Cu(II) [73, 77]. Siendo las concentraciones más altas de cada metal, empleadas en nuestras pruebas de sensibilización y/o re-sensibilización, 4 mM (254 ppm) para Cu(II), 1 mM (65 ppm) para Zn(II), 0.5 mM (29 ppm) para Co(II), 0.5 mM (56 ppm) para Cd(II) y 2 mM (117 ppm) para Ni(II), emplear estas combinaciones en formulaciones de aplicación tópica presenta un área de oportunidad para las estrategias a las cuales se enfoca el presente.

Las infecciones de piel y tejidos suaves tienen una gran incidencia tanto en la comunidad como en los hospitales, se ha reportado que ocupan el lugar número 28 de diagnóstico más común en pacientes hospitalizados, estimando un costo anual de \$350 millones de dólares solo para las infecciones no complicadas[78-80]. Las infecciones de este tipo causadas por patógenos multi-resistentes han incrementado en los últimos años, lo que sugiere el uso de terapias alternativas para su tratamiento[81]. Esta es un área de gran oportunidad donde aplicar lo expresado en este trabajo, ya que combinar agentes antimicrobianos, como lo son los metales y los antibióticos que aquí se expresan, se tiene una mejor oportunidad de combatir este tipo de microorganismos, por la

oportunidad de que estos presenten efecto sinérgico, lo cual conllevaría a utilizar concentraciones más bajas de cada componente, además de que el efecto sinérgico puede prevenir la aparición de microorganismos resistentes[82]. Esto lo pudimos observar en nuestros resultados, donde con las combinaciones utilizadas logramos sensibilizar a bacterias susceptibles utilizando concentraciones menores a su respectiva CMI, además logramos re-sensibilizar bacterias resistentes a los antibióticos utilizados.

Los experimentos incluidos en este estudio muestran que la realización de combinaciones metal-antibiótico representa una estrategia tanto para inhibir el crecimiento de bacterias sensibles a antibióticos como para la re-sensibilización de aquellas que ya posean algún tipo de resistencia, según se muestra en la evidencia *in vitro* obtenida. Como perspectivas a futuro sobre lo experimentado en este proyecto se pueden realizar pruebas para determinar mecanismos por los cuales los metales ejercen su acción sobre los microorganismos de estudio estando solos y en combinación con los antibióticos, así como cuando se encuentran en combinación con las cepas resistentes, con el objetivo de especular sobre su influencia en la re-sensibilización observada en el presente. El estudio de modelos de infección *in vivo* para observar si estas combinaciones poseen la capacidad de combatir las infecciones que se pretende como perspectivas del presente trabajo.

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación podemos realizar ciertas conclusiones.

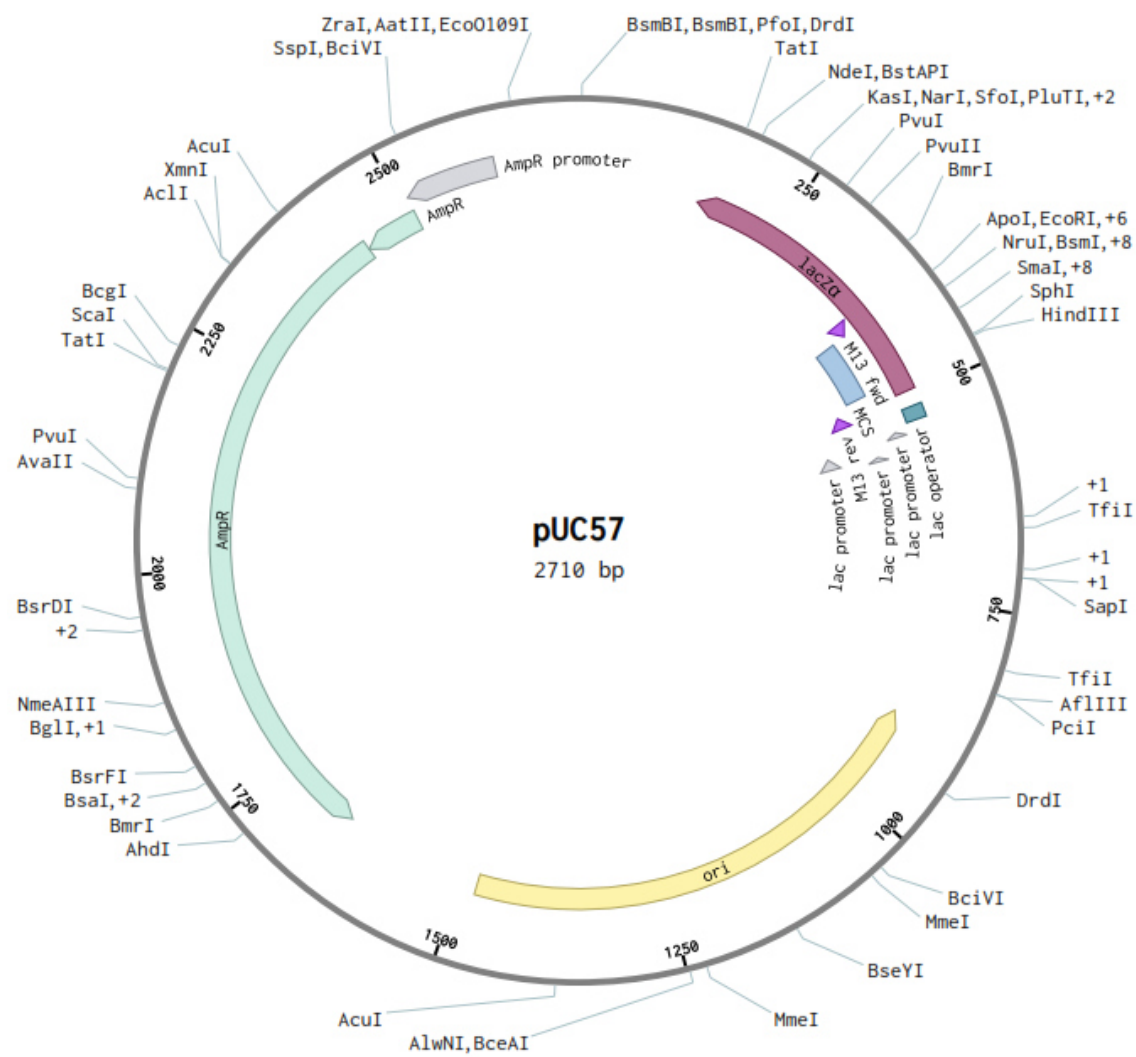
- Los metales de transición Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II) y Cd(II) son capaces de ejercer un efecto inhibitorio sobre *E. coli* y *S. aureus* a concentraciones menores a 10 mM.
- Cu(II), Zn(II), Co(II) y Cd(II) son capaces de sensibilizar cultivos de *E. coli* a kanamicina, mientras que Cu(II), Co(II), Cd(II) y Ni(II) son capaces de producir este efecto hacia ampicilina.
- Cu(II), Zn(II), Co(II), Cd(II) y Ni(II) poseen la capacidad de sensibilizar *S. aureus* a kanamicina, mientras que solo Ni(II) fue capaz de sensibilizar esta cepa a los antibióticos β -lactámicos ampicilina y metilicina.
- La cepa *E. coli* ATCC 11229 no presenta inhibición tanto en la presencia de metilicina, a las concentraciones de estudio, como en las combinaciones metal-ciprofloxacino realizadas.

- Cu(II) y Cd(II) poseen la capacidad de disminuir el conteo de células viables al combinarse con ampicilina en cultivos de *E. coli* en fase estacionaria, así como Ni(II) al ser utilizado con este antibiótico en cultivos de fase estacionaria de *S. aureus*.
- Al combinarse con kanamicina, Cu(II), Zn(II) y Cd(II) son capaces de causar una re-sensibilización a este antibiótico en cultivos de *E. coli* y *S. aureus* resistentes al mismo.
- Al combinarse con ampicilina, Cu(II), Co(II) y Ni(II) poseen la capacidad de re-sensibilizar *E. coli* resistente a este antibiótico.
- Ninguno de los metales, a las concentraciones utilizadas en este estudio, fue capaz de re-sensibilizar a *S. aureus* resistente a ampicilina, o a *S. aureus* resistente a metilicina.
- Por último cabe concluir que utilizar los metales de transición Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II) y Cd(II) para disminuir la capacidad de crecimiento de las bacterias resistentes a antibióticos es un área de oportunidad para combatir los problemas de enfermedades infecciosas persistentes por este tipo de bacterias.

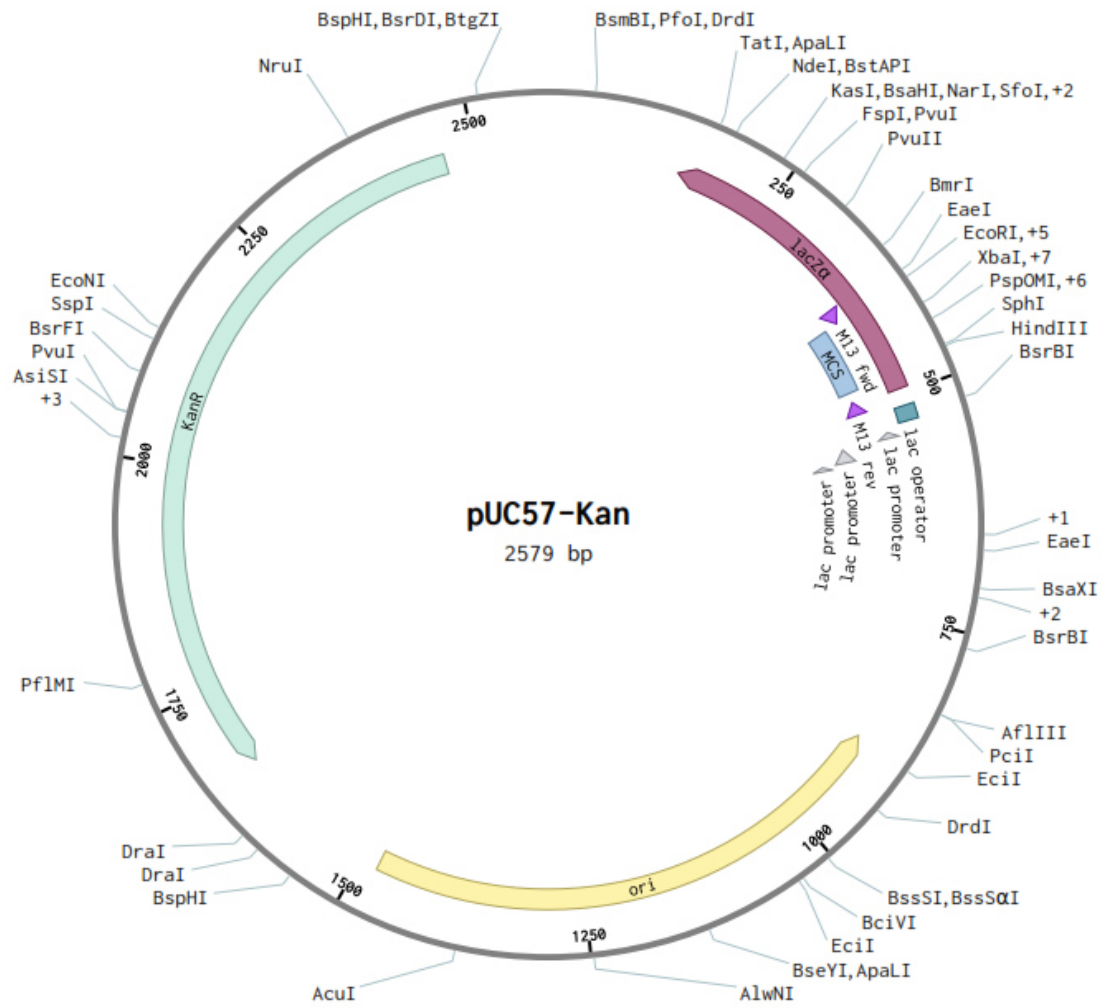
CAPÍTULO 8

8. REFERENCIAS

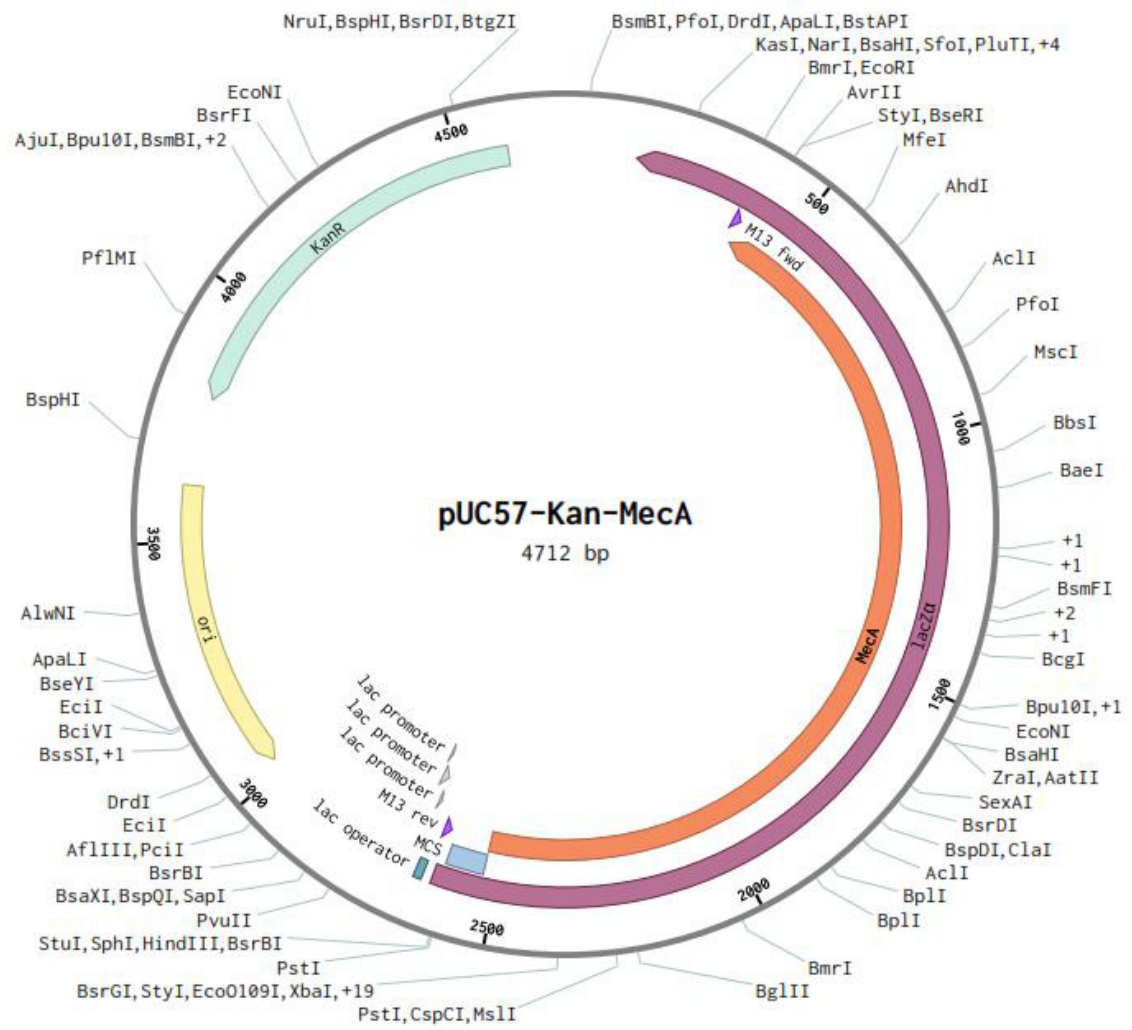
Anexo 1: Plásmidos de resistencia



Plásmido de resistencia a ampicilina pUC57-simple



Plásmido de resistencia a kanamicina pUC57-kan



Plásmido de resistencia a meticilina pUC57-Kan-Met

CAPÍTULO 9

9. REFERENCIAS

1. Walsh, C. and G. Wright, *Introduction: antibiotic resistance*. Chemical reviews, 2005. **105**(2): p. 391-394.
2. OMS. *Resistencia a los antimicrobianos*. 2014 [cited 2014 3 Agosto]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>.
3. Tan, Y.-T., D.J. Tillett, and I.A. McKay, *Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria*. Molecular medicine today, 2000. **6**(8): p. 309-314.
4. Levy, S.B. and B. Marshall, *Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses*. Nature medicine, 2004. **10**: p. S122-S129.
5. Levy, S.B., *The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers*. 2002: Da Capo Press.
6. Worthington, R.J. and C. Melander, *Overcoming resistance to β -lactam antibiotics*. The Journal of organic chemistry, 2013. **78**(9): p. 4207-4213.
7. Andersson, D.I. and D. Hughes, *Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?* Nature Reviews Microbiology, 2010. **8**(4): p. 260-271.
8. OMS. *El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo*. 2014 [cited 2014 3 Agosto]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>.
9. Kim, T., P.I. Oh, and A.E. Simor, *The economic impact of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Canadian hospitals*. Infection Control, 2001. **22**(02): p. 99-104.
10. Walsh, C., *Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 775-781.
11. KONG, K.F., L. Schneper, and K. Mathee, *Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology*. Apmis, 2010. **118**(1): p. 1-36.
12. Autiero, I., S. Costantini, and G. Colonna, *Modeling of the bacterial mechanism of methicillin-resistance by a systems biology approach*. PloS one, 2009. **4**(7): p. e6226.

13. Maruthi Chittapragada, S.R. and Y.W. Ham, *Aminoglycosides: molecular insights on the recognition of RNA and aminoglycoside mimics*. Perspectives in medicinal chemistry, 2009. **3**: p. 21.
14. Mingeot-Leclercq, M.-P., Y. Glupczynski, and P.M. Tulkens, *Aminoglycosides: activity and resistance*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1999. **43**(4): p. 727-737.
15. Scientific, T. *Analysis of the aminoglycoside antibiotics kanamycin and amikacin matches USP requirements*. 2011 [cited 2015 11 Diciembre]; Available from: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/109787-AN267-IC-KanamycinAmikacin-HPAEPAD-18Jan2011-LPN2663-R2.pdf>.
16. Sarkozy, G., *Quinolones: a class of antimicrobial agents*. VETERINARNI MEDICINA-PRAHA-, 2001. **46**(9/10): p. 257-274.
17. Martinko, J.M., et al., *Brock Biología de los microorganismos*. 2009, PEARSON EDUCACIÓN, S.A.
18. Yenofsky, R.L., M. Fine, and J.W. Pellow, *A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(9): p. 3435-3439.
19. Nies, D.H. and S. Silver, *Molecular microbiology of heavy metals*. Vol. 6. 2007: Springer Science & Business Media.
20. Lemire, J.A., J.J. Harrison, and R.J. Turner, *Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications*. Nature Reviews Microbiology, 2013. **11**(6): p. 371-384.
21. Waldron, K.J. and N.J. Robinson, *How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?* Nature Reviews Microbiology, 2009. **7**(1): p. 25-35.
22. Grass, G., C. Rensing, and M. Solioz, *Metallic copper as an antimicrobial surface*. Applied and environmental microbiology, 2011. **77**(5): p. 1541-1547.
23. Harrison, J.J., et al., *Chromosomal antioxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance*. Environmental microbiology, 2009. **11**(10): p. 2491-2509.
24. Valko, M., H. Morris, and M. Cronin, *Metals, toxicity and oxidative stress*. Current medicinal chemistry, 2005. **12**(10): p. 1161-1208.
25. Workentine, M.L., et al., *Pseudomonas fluorescens' view of the periodic table*. Environmental microbiology, 2008. **10**(1): p. 238-250.
26. Xu, F.F. and J.A. Imlay, *Silver (I), mercury (II), cadmium (II), and zinc (II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify Escherichia coli*. Applied and environmental microbiology, 2012. **78**(10): p. 3614-3621.
27. Solioz, M., et al., *Response of Gram-positive bacteria to copper stress*. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2010. **15**(1): p. 3-14.
28. Phan, T.N., et al., *Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms*. Oral microbiology and immunology, 2004. **19**(1): p. 31-38.
29. McDevitt, C.A., et al., *A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc*. PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002357-e1002357.

30. Savage, P.B., *Multidrug-resistant bacteria: overcoming antibiotic permeability barriers of gram-negative bacteria*. Annals of medicine, 2001. **33**(3): p. 167-171.
31. Marks, L.R., E.A. Clementi, and A.P. Hakansson, *Sensitization of Staphylococcus aureus to methicillin and other antibiotics in vitro and in vivo in the presence of HAMLET*. 2013.
32. Rai, M., A. Yadav, and A. Gade, *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. Biotechnology advances, 2009. **27**(1): p. 76-83.
33. Magner, L., *Hippocrates and the Hippocratic Tradition. A History of Medicine*. 1992, Marcel Dekker, Inc., New York.
34. Stanić, V., et al., *Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders*. Applied Surface Science, 2010. **256**(20): p. 6083-6089.
35. Percival, S.L., et al., *The antimicrobial efficacy of silver on antibiotic-resistant bacteria isolated from burn wounds*. International wound journal, 2012. **9**(5): p. 488-493.
36. Morones-Ramirez, J.R., et al., *Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria*. Science translational medicine, 2013. **5**(190): p. 190ra81-190ra81.
37. Kim, T., et al., *Antimicrobial effects of metal ions (Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in hydroxyapatite*. Journal of materials science: Materials in Medicine, 1998. **9**(3): p. 129-134.
38. Li, J., et al., *Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections*. The Lancet infectious diseases, 2006. **6**(9): p. 589-601.
39. Walkenhorst, W.F., J.N. Sundrud, and J.M. Laviolette, *Additivity and synergy between an antimicrobial peptide and inhibitory ions*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2014. **1838**(9): p. 2234-2242.
40. Bagihalli, G.B., et al., *Synthesis, spectral characterization, in vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of Co (II), Ni (II) and Cu (II) complexes with 1, 2, 4-triazole Schiff bases*. European journal of medicinal chemistry, 2008. **43**(12): p. 2639-2649.
41. Chohan, Z.H., C.T. Supuran, and A. Scozzafava, *Metalloantibiotics: synthesis and antibacterial activity of cobalt (II), copper (II), nickel (II) and zinc (II) complexes of kefzol*. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry, 2004. **19**(1): p. 79-84.
42. Kasuga, N.C., et al., *Synthesis, structural characterization and antimicrobial activities of 4-and 6-coordinate nickel (II) complexes with three thiosemicarbazones and semicarbazone ligands*. Journal of inorganic biochemistry, 2001. **84**(1): p. 55-65.
43. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning*. Vol. 2. 1989: Cold spring harbor laboratory press New York.
44. Cavalieri, J., et al., *Manual of antimicrobial susceptibility testing*. American Society for Microbiology, Seattle, Washington, 2005.
45. Andrews, J.M., *Determination of minimum inhibitory concentrations*. Journal of antimicrobial Chemotherapy, 2001. **48**(suppl 1): p. 5-16.

46. Pillai, S.K., R. Moellering, and G.M. Eliopoulos, *Antimicrobial combinations*. Antibiotics in laboratory medicine, 2005. **5**: p. 365-440.
47. Orhan, G., et al., *Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against Brucella melitensis*. Journal of clinical microbiology, 2005. **43**(1): p. 140-143.
48. Hegreness, M., et al., *Accelerated evolution of resistance in multidrug environments*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(37): p. 13977-13981.
49. Beard, S.J., et al., *Zinc (II) tolerance in Escherichia coli K-12: evidence that the zntA gene(o 732) encodes a cation transport ATPase*. Molecular microbiology, 1997. **25**(5): p. 883-891.
50. Brocklehurst, K.R. and A.P. Morby, *Metal-ion tolerance in Escherichia coli: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology*. Microbiology, 2000. **146**(9): p. 2277-2282.
51. Spada, S., T.J. Pembroke, and G.J. Wall, *Isolation of a novel Thermus thermophilus metal efflux protein that improves Escherichia coli growth under stress conditions*. Extremophiles, 2002. **6**(4): p. 301-308.
52. Kershaw, C.J., et al., *The expression profile of Escherichia coli K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations*. Microbiology, 2005. **151**(4): p. 1187-1198.
53. Grass, G. and C. Rensing, *Genes involved in copper homeostasis in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 2001. **183**(6): p. 2145-2147.
54. Lee, L.J., J.A. Barrett, and R.K. Poole, *Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured Escherichia coli to zinc*. Journal of bacteriology, 2005. **187**(3): p. 1124-1134.
55. Bajaksouzian, S., et al., *Activities of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with amikacin, against acinetobacters as determined by checkerboard and time-kill studies*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1997. **41**(5): p. 1073-1076.
56. Hsieh, M.H., et al., *Synergy assessed by checkerboard a critical analysis*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 1993. **16**(4): p. 343-349.
57. Sweeney, M.T. and G.E. Zurenko, *In vitro activities of linezolid combined with other antimicrobial agents against staphylococci, enterococci, pneumococci, and selected gram-negative organisms*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2003. **47**(6): p. 1902-1906.
58. Li, R.C., D.E. Nix, and J.J. Schentag, *Interaction between ciprofloxacin and metal cations: its influence on physicochemical characteristics and antibacterial activity*. Pharmaceutical research, 1994. **11**(6): p. 917-920.
59. Anaconda, J.R. and C. Toledo, *Synthesis and antibacterial activity of metal complexes of ciprofloxacin*. Transition Metal Chemistry, 2001. **26**(1-2): p. 228-231.
60. Lin, Y.-S.E., et al., *Individual and combined effects of copper and silver ions on inactivation of Legionella pneumophila*. Water Research, 1996. **30**(8): p. 1905-1913.
61. Huang, H.-I., et al., *In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia and*

- Acinetobacter baumannii*: implications for on-site disinfection for hospital infection control. Water research, 2008. **42**(1): p. 73-80.
62. Anacona, J., *Synthesis and antibacterial activity of some metal complexes of beta-lactamic antibiotics*. Journal of coordination chemistry, 2001. **54**(3-4): p. 355-365.
 63. El-Gamel, N.E., *Metal chelates of ampicillin versus amoxicillin: synthesis, structural investigation, and biological studies*. Journal of Coordination Chemistry, 2010. **63**(3): p. 534-543.
 64. Bravo, A. and J. Anacona, *Synthesis and characterization of metal complexes with ampicillin*. Journal of coordination chemistry, 1998. **44**(1-2): p. 173-182.
 65. Lima, D.A.F.d.S., et al., *In vitro activity of antimicrobial combinations against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2013. **46**(3): p. 299-303.
 66. O'Brien, F., et al., *Staphylococcus aureus plasmids without mobilization genes are mobilized by a novel conjugative plasmid from community isolates*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2015. **70**(3): p. 649-652.
 67. Dominguez, W. and D.J. O'Sullivan, *Developing an efficient and reproducible conjugation-based gene transfer system for bifidobacteria*. Microbiology, 2013. **159**(2): p. 328-338.
 68. Taylor, P.W., P.D. Stapleton, and J.P. Luzio, *New ways to treat bacterial infections*. Drug discovery today, 2002. **7**(21): p. 1086-1091.
 69. Vaara, M. and T. Vaara, *Sensitization of Gram-negative bacteria to antibiotics and complement by a nontoxic oligopeptide*. 1983.
 70. Vaara, M. and T. Vaara, *Polycations sensitize enteric bacteria to antibiotics*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1983. **24**(1): p. 107-113.
 71. Brehm-Stecher, B.F. and E.A. Johnson, *Sensitization of Staphylococcus aureus and Escherichia coli to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2003. **47**(10): p. 3357-3360.
 72. Registry, A.f.T.S.a.D. *Toxicological profile for copper*. 2004 [cited 2016 March]; Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>.
 73. Registry, A.f.T.S.a.D. *Toxicological profile for zinc*. 2005 [cited 2016 March]; Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60.pdf>.
 74. Registry, A.f.T.S.a.D. *Toxicological profile for cobalt*. 2004 [cited 2016 March]; Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp33-p.pdf>.
 75. Registry, A.f.T.S.a.D. *Toxicological profile for cadmium*. 2012 [cited 2016 March]; Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp5.pdf>.
 76. Registry, A.f.T.S.a.D. *Toxicological profile for nickel*. 2005 [cited 2016 March]; Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp15.pdf>.
 77. Review, C.I. *Safety Assessment of Inorganic Sulfates as Used in Cosmetics*. 2013 [cited 2016 March]; Available from: <http://www.cir-safety.org/sites/default/files/inorgs032014slr.pdf>.
 78. Weigelt, J., et al., *Linezolid versus vancomycin in treatment of complicated skin and soft tissue infections*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2005. **49**(6): p. 2260-2266.

79. Stulberg, D.L., M.A. Penrod, and R.A. Blatny, *Common bacterial skin infections*. American family physician, 2002. **66**(1): p. 119-128.
80. Pangilinan, R., A. Tice, and G. Tillotson, *Topical antibiotic treatment for uncomplicated skin and skin structure infections: review of the literature*. Expert review of anti-infective therapy, 2009. **7**(8): p. 957-965.
81. Grosse, E.E., et al., *The efficacy and safety of tigecycline in the treatment of skin and skin-structure infections: results of 2 double-blind phase 3 comparison studies with vancomycin-aztreonam*. Clinical infectious diseases, 2005. **41**(Supplement 5): p. S341-S353.
82. Rahal, J.J., *Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter species*. Clinical infectious diseases, 2006. **43**(Supplement 2): p. S95-S99.